

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER
BIOLOGISCHE, CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE
UNTERSCHIEDE BEI VERSCHIEDENEN
RHINOPNEUMONITISVIRUSSTÄMMEN**

ADELHEID VON STRENGE

München 1972

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten
der Tiere
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Professor Dr. A. Ma y r

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER
BIOLOGISCHE, CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE
UNTERSCHIEDE BEI VERSCHIEDENEN
RHINOPNEUMONITISVIRUSTÄMMEN**



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung
der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
ADELHEID VON STRENGE
aus Salisbury

München 1972

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. Boessneck
Referent: Prof. Dr. A. Mayr
Korreferent: Priv.Do. Dr. M.J. Forstner

Tag der Promotion: 11. 2. 1972



Meinen Eltern
und Hanspeter
in Dankbarkeit gewidmet

1.1.1	Einleitung	1
1.1.2	Die Bedeutung der Eltern	2
1.1.3	Die Bedeutung von Hanspeter	3
1.1.4	Die Bedeutung der Dankbarkeit	4
1.1.5	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	5
1.1.6	Die Bedeutung der Dankbarkeit	6
1.1.7	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	7
1.1.8	Die Bedeutung der Dankbarkeit	8
1.1.9	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	9
1.1.10	Die Bedeutung der Dankbarkeit	10
1.1.11	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	11
1.1.12	Die Bedeutung der Dankbarkeit	12
1.1.13	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	13
1.1.14	Die Bedeutung der Dankbarkeit	14
1.1.15	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	15
1.1.16	Die Bedeutung der Dankbarkeit	16
1.1.17	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	17
1.1.18	Die Bedeutung der Dankbarkeit	18
1.1.19	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	19
1.1.20	Die Bedeutung der Dankbarkeit	20
1.1.21	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	21
1.1.22	Die Bedeutung der Dankbarkeit	22
1.1.23	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	23
1.1.24	Die Bedeutung der Dankbarkeit	24
1.1.25	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	25
1.1.26	Die Bedeutung der Dankbarkeit	26
1.1.27	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	27
1.1.28	Die Bedeutung der Dankbarkeit	28
1.1.29	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	29
1.1.30	Die Bedeutung der Dankbarkeit	30
1.1.31	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	31
1.1.32	Die Bedeutung der Dankbarkeit	32
1.1.33	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	33
1.1.34	Die Bedeutung der Dankbarkeit	34
1.1.35	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	35
1.1.36	Die Bedeutung der Dankbarkeit	36
1.1.37	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	37
1.1.38	Die Bedeutung der Dankbarkeit	38
1.1.39	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	39
1.1.40	Die Bedeutung der Dankbarkeit	40
1.1.41	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	41
1.1.42	Die Bedeutung der Dankbarkeit	42
1.1.43	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	43
1.1.44	Die Bedeutung der Dankbarkeit	44
1.1.45	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	45
1.1.46	Die Bedeutung der Dankbarkeit	46
1.1.47	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	47
1.1.48	Die Bedeutung der Dankbarkeit	48
1.1.49	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	49
1.1.50	Die Bedeutung der Dankbarkeit	50
1.1.51	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	51
1.1.52	Die Bedeutung der Dankbarkeit	52
1.1.53	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	53
1.1.54	Die Bedeutung der Dankbarkeit	54
1.1.55	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	55
1.1.56	Die Bedeutung der Dankbarkeit	56
1.1.57	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	57
1.1.58	Die Bedeutung der Dankbarkeit	58
1.1.59	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	59
1.1.60	Die Bedeutung der Dankbarkeit	60
1.1.61	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	61
1.1.62	Die Bedeutung der Dankbarkeit	62
1.1.63	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	63
1.1.64	Die Bedeutung der Dankbarkeit	64
1.1.65	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	65
1.1.66	Die Bedeutung der Dankbarkeit	66
1.1.67	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	67
1.1.68	Die Bedeutung der Dankbarkeit	68
1.1.69	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	69
1.1.70	Die Bedeutung der Dankbarkeit	70
1.1.71	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	71
1.1.72	Die Bedeutung der Dankbarkeit	72
1.1.73	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	73
1.1.74	Die Bedeutung der Dankbarkeit	74
1.1.75	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	75
1.1.76	Die Bedeutung der Dankbarkeit	76
1.1.77	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	77
1.1.78	Die Bedeutung der Dankbarkeit	78
1.1.79	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	79
1.1.80	Die Bedeutung der Dankbarkeit	80
1.1.81	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	81
1.1.82	Die Bedeutung der Dankbarkeit	82
1.1.83	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	83
1.1.84	Die Bedeutung der Dankbarkeit	84
1.1.85	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	85
1.1.86	Die Bedeutung der Dankbarkeit	86
1.1.87	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	87
1.1.88	Die Bedeutung der Dankbarkeit	88
1.1.89	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	89
1.1.90	Die Bedeutung der Dankbarkeit	90
1.1.91	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	91
1.1.92	Die Bedeutung der Dankbarkeit	92
1.1.93	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	93
1.1.94	Die Bedeutung der Dankbarkeit	94
1.1.95	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	95
1.1.96	Die Bedeutung der Dankbarkeit	96
1.1.97	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	97
1.1.98	Die Bedeutung der Dankbarkeit	98
1.1.99	Die Bedeutung der Eltern und Hanspeter	99
1.1.100	Die Bedeutung der Dankbarkeit	100

-INHALTSVERZEICHNIS-

1.	E I N L E I T U N G	4
2.	S C H R I F T T U M	5
2.1.	.. M A R K E R A L L G E M E I N	5
2.1.1.	DEFINITION	5
2.1.2.	BEDEUTUNG	5
2.1.2.1.	Grundlagenforschung	5
2.1.2.2.	Impfstoffprüfung und Identifizierung von Impfstämmen	6
2.1.3.	BIOLOGISCHE MARKER	7
2.1.3.1.	Virulenz	7
2.1.3.2.	"In vivo"-Affinität für Zellen der natürlichen Eintrittsporten bzw. Zellen bestimmter Manifestationsorgane	9
2.1.3.3.	"In vitro"-Adsorption an suspendierte Zellen	10
2.1.3.4.	Immunogenität	10
2.1.3.5.	Resistenz gegenüber spezifischen und unspezifischen Abwehrmechanismen	11
2.1.3.5.1.	IST-Marker (intraserotypische Differenzierung)	12
2.1.3.5.2.	Resistenz gegenüber Interferon	13
2.1.3.5.3.	rct-Marker (reproductive capacity at high temperature, Vermehrungsfähigkeit bei hohen Temperaturen)	14
2.1.3.5.4.	d-Marker (Vermehrungsfähigkeit unter saurem Agar)	16
2.1.3.5.5.	Resistenz gegenüber Inhibitoren, besonders gegenüber Seruminhibitoren	17
2.1.3.6.	Wirtsspektrum auf zellulärer Ebene	17
2.1.4.	PHYSIKALISCHE UND CHEMISCHE MARKER	20
2.1.4.1.	T-Marker (Thermoresistenz gegenüber 56°C)	20
2.1.4.2.	Sedimentation im D ₂ O-H ₂ O Dichtegradienten	22
2.1.4.3.	Sedimentation im CsCl Dichtegradienten	22
2.1.4.4.	Sedimentation in Dichtegradienten von Dextransulfat (DS) und Diäthylaminoäthylen-Dextran (DEAE-Dextran)	23
2.1.4.5.	pH-Marker (Säurestabilität)	24
2.1.4.6.	Resistenz gegenüber Formalin	24
2.1.4.7.	A-Marker (Thermoresistenz in Gegenwart von Al ⁺⁺⁺)	25
2.1.4.8.	Aa-Marker (Adsorption an Al ⁺⁺⁺)	27
2.1.4.9.	e-Marker (chromatographisches Verhalten gegenüber DEAE-Zellulose-Säule)	28
2.1.4.10.	Chromatographisches Verhalten gegenüber Calciumphosphat	28

2.1.4.11.	Verhalten gegenüber Polyanionen (Dextransulfat, DS) und Polykationen (Diäthylaminoäthylen, DEAE)	30
2.1.4.11.1.	m-Marker (Vermehrungsfähigkeit in Gegenwart von Polyanionen im Medium)	30
2.1.4.11.2.	Verhalten gegenüber Polyionen im wäßrigen Phasen- system	31
2.1.4.11.3.	Verhalten gegenüber Polyionen in der Ionenaus- tauschchromatographie	32
2.2.	MARKER BEI RHINOPNEUMONITIS	35
2.2.1.	BIOLOGISCHE MARKER	35
2.2.1.1.	Virulenz für Pferde	35
2.2.1.2.	Virulenz für Hamster	36
2.2.1.3.	Wirtsspektrum auf zellulärer Ebene	37
2.2.2.	CHEMISCHE UND PHYSIKALISCHE MARKER	38
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	39
3.1.	MATERIAL UND METHODEN	39
3.1.1.	VIRUSSTÄMME	39
3.1.2.	ZELLKULTUREN	39
3.1.3.	VIRUSPASSAGEN UND TITRATIONEN	40
3.1.4.	ANFERTIGUNG VON ZELLKULTURPRÄPARATEN	41
3.1.5.	MARKERTESTS	41
3.1.5.1.	Versuche mit biologischen Markern	41
3.1.5.1.1.	Verhalten in Zellkulturen	41
3.1.5.1.2.	Adsorptionsversuche an Pferdelymphozyten	42
3.1.5.1.3.	Adsorption an Pferdeleukozyten	42
3.1.5.2.	Versuche mit chemisch-physikalischen Markern	43
3.1.5.2.1.	Thermoresistenz in Aqua dest. bei 50°C	43
3.1.5.2.2.	Thermoresistenz in 2m-MgCl ₂ -Lösung bei 50°C	43
3.1.5.2.3.	Thermoresistenz in PBS bei 50°C	43
3.1.5.2.4.	Trypsinresistenz	44
3.1.5.2.5.	Säuretest bei pH 3,0 und pH 5,6	44
3.2.	ERGEBNISSE	45
3.2.1.	BIOLOGISCHE MARKER	45
3.2.1.1.	Verhalten in verschiedenen Zellkulturen	45
3.2.1.2.	Adsorption an Lymphzellen und Leukozyten des Pferdes	50
3.2.2.	CHEMISCH-PHYSIKALISCHE MARKER	52
3.2.2.1.	Thermoresistenz in Aqua dest. bei 50°C	52

3.2.2.2.	Thermoresistenz in 2m-MgCl ₂ bei 50°C	53
3.2.2.3.	Thermoresistenz in PBS bei 50°C	55
3.2.2.4.	Trypsinresistenz	55
3.2.2.5.	Säurestabilität gegenüber pH 3,0 und 5,6	56
3.3.	DISKUSSION	57
3.4.	ZUSAMMENFASSUNG	60
4.	ABKÜRZUNGEN	62
5.	LITERATURVERZEICHNIS	63
	Lebenslauf	70

1. EINLEITUNG

Die durch das Rhinopneumonitisvirus, den Erreger des seuchenhaften Stutenabortes, hervorgerufene Erkrankung der Pferde ist seit mehr als 30 Jahren bekannt und auf der ganzen Welt verbreitet (36, 47). Die Krankheit befällt Pferde jeglichen Alters, führt hauptsächlich durch Aborte tragender Stuten, aber auch durch respiratorische Erkrankungen der Jungtiere und teilweise der erwachsenen Tiere zu wirtschaftlichen Verlusten und stellt wegen ihrer hohen Ansteckungsfähigkeit und raschen Verbreitung ein ernstes Problem für Gestüte und Rennställe dar (36, 51).

Die bisher isolierten Rhinopneumonitisstämme gehören einem einheitlichen Serotyp an. Mit dem Neutralisationstest lassen sich zwei Subtypen unterscheiden (36, 53). Repräsentiert wird der Subtyp 1 durch den Stamm Kentucky D und der Subtyp 2 durch die Stämme Army 183, Japanese H 45 und verschiedene europäische Stämme (14). Diese können auf Grund ihres biologischen Verhaltens unterschieden werden. So lassen sich einige Stämme soweit attenuieren, daß sie ihre Virulenz, nicht aber ihre immunisierenden Eigenschaften verlieren und sich dadurch zur Herstellung eines Lebendimpfstoffes anbieten (21, 22, 36).

An verschiedenen Instituten der Welt ist man bemüht, einen wirksamen Rhinopneumonitisimpfstoff zu entwickeln. Trotz leichter Inaktivierungsmöglichkeiten des Rhinopneumonitisvirus (29) konnte bisher ein wirksamer Impfstoff nur auf der Basis attenuierter Virusstämme hergestellt werden (22, 37, 46). Wegen der besonderen Probleme, die mit der Anwendung von Lebendimpfstoffen verbunden sind, ist man daran interessiert, Unterscheidungsmerkmale zwischen Feldstämmen untereinander und zwischen Feldstämmen und attenuierten Stämmen zu finden; besonders in der Impfstoffprophylaxe ist man auf konstante und reproduzierbare Merkmale angewiesen. Aufgabe vorliegender Arbeit war es, geeignete Methoden zur Unterscheidung von Rhinopneumonitisstämmen zu finden und einen Beitrag zum Problem "Marker für attenuierte Rhinopneumonitis-Viruslinien" zu liefern.

2. SCHRIFTTUM

2.1. MARKER ALLGEMEIN

2.1.1. DEFINITION

Marker sind stabile, d.h. genetisch verankerte, biologische oder chemisch - physikalische Merkmale serologisch gleicher Virusstämme, die sich im Experiment besonders gut nachweisen lassen. Sie äußern sich in einem unterschiedlichen Verhalten zweier oder mehrerer Virusstämme des gleichen Serotyps bei gleichen Versuchsbedingungen.

2.1.2. BEDEUTUNG

Marker haben in dreierlei Weise Bedeutung erlangt:

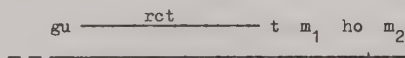
1. in der Grundlagenforschung zum Studium genetischer Merkmale, der Informationsansammlung und -übertragung, der Mutation, Rekombination und Transduktion.
2. in der Impfstoffprüfung, zur Kontrolle der Stabilität bzw. Veränderlichkeit von vermehrungsfähigen Impfstämmen.
3. bei Impfschäden nach Applikation von Lebendvaccinen zur Identifizierung des Impfstammes.

2.1.2.1. Grundlagenforschung

Jede genetisch verankerte Eigenschaft kann als Marker benutzt werden, wenn sie sich gut im Labor nachweisen läßt. Sie dient als Anhaltspunkt für genetische Beobachtungen. Zur Erforschung der Nukleinsäurestruktur arbeitet Bengtsson (8) mit Rekombinationen von Guanidin-resistenten (gu^+) und Pferdeserum-resistenten (ho^+) Poliomyelitisstämmen, die zusätzlich auf das Vorhandensein eines dritten Markers untersucht wurden. Für die Selektion eindeutiger Rekombinationen müssen Merkmale gewählt werden, die unabhängig von einander auftreten und an verschiedenen Stellen im Genom lokalisiert sind. Hierfür verwendete er folgende Versuchsanordnung: 0,2 ml Virusmaterial, das zu gleichen Teilen beide Varianten (gu^+ und ho^+) mit dem 3. Marker enthielt (Dosis ca. 50 PBE/Zelle) wurden 30 Minuten

an MK-Zellen (ca. 2×10^5 Zellen/Röhrchen) adsorbiert und 17 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach einer Selektion von gu^+ho^+ Verbindungen unter Guanidin-haltigem und Serum-haltigem Agar wurde zusätzlich das Vorhandensein des 3. Markers wie $rct/39^\circ$ (Vermehrungsfähigkeit bei 39°C), t (Thermoresistenz bei 50°C) und m (Ausbildung kleiner Plaques) untersucht. Der Anteil positiver oder negativer $rct/39^\circ$, t - und m -Marker zusammen mit gu^+ho^+ Varianten zeigt dann ungefähr die Lage dieser Marker zueinander im Genom an; je weiter Gene auseinander liegen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß sie in den Spaltprodukten wieder erscheinen.

An Hand seiner Beobachtungen stellte Bengtsson (7,8) folgende Genkarte auf:



2.1.2.2. Impfstoffprüfung und Identifizierung von Impfstämmen

Marker haben vor allen Dingen bei der Prüfung von Lebendimpfstoffen Bedeutung. Durch den Nachweis bestimmter stabiler Eigenschaften kann man die Virusernten und das für die Impfstoffherstellung benutzte Virusausgangsmaterial laufend auf Reinheit bzw. Kontamination prüfen. Darüber hinaus läßt sich die Stabilität des Impfstammes an Hand der Marker gut nachweisen.

Bei Lebendimpfstoffen ist besonders die Virulenz des verwendeten Impfstammes von Bedeutung. Sie stellt deshalb den wichtigsten Marker dar. Zum Nachweis der Virulenz mußte man stets die Tierespezies heranziehen, an der der Impfstoff zum Einsatz kommen sollte. Dieses ist leider nicht immer möglich. Aus diesem Grunde hat man versucht, die Virulenz in anderen Wirtssystemen zu erfassen oder andere genetisch fixierte Eigenschaften von Impfstämmen, die der Virulenz parallel laufen, anstelle der Virulenz zu benutzen. Alle nicht auf der Virulenz aufbauenden Marker sind bei der Impfstoffprüfung deshalb Aushilfen, und man ist immer wieder versucht, wie in Bezug zu der Virulenz des Impfstammes zu setzen.

Neben der Impfstoffprüfung sind Marker der jeweiligen Impfstämme auch für die Beurteilung von Impfschadens-

fällen außerordentlich wichtig. Treten nach einer Schutzimpfung mit Lebendimpfstoffen Impferkrankungen oder auch postvaccinale Schäden auf, die der homologen Erkrankung ähneln, dann muß geprüft werden, ob der Impfstoff oder der virulente Feldstamm hierfür verantwortlich ist. Häufig ist eine Differenzierung zwischen diesen beiden Stämmen nur auf Grund bestimmter Marker des Impfstoffes möglich.

Man unterscheidet zwischen biologischen, physikalischen und chemischen Markern.

2.1.3. BIOLOGISCHE MARKER

Unter biologischen Markern versteht man ganz bestimmte biologische Merkmale eines Virusstammes, die sich in bestimmten Zell- und Wirtssystemen reproduzieren lassen. Die genaue Definition oder Abgrenzung des Begriffes "biologischer Marker" ist dadurch erschwert, daß Virus, Zelle und Wirt ein biologisches Komplexsystem darstellen, in dem sich die einzelnen Faktoren gegenseitig beeinflussen.

Derzeit sind folgende brauchbare biologische Merkmale bekannt:

- a) Virulenz
- b) "In vivo"-Affinität für Zellen der natürlichen Eintrittspforten bzw. für Zellen bestimmter Manifestationsorgane
- c) "In vitro"-Adsorption an suspendierte Zellen
- d) Immunogenität
- e) Labilität gegenüber Antikörpern
- f) Resistenz gegenüber Serum-inhibitoren
- g) Resistenz gegenüber Interferon
- h) Vermehrungsfähigkeit bei verschiedenen Umweltsbedingungen
- i) Wirtsspektrum auf zellulären Ebenen

2.1.3.1. Virulenz

Die Virulenz eines Virusstammes ist sein wichtigster Marker. Unter Virulenz versteht man den Grad der krankmachenden Eigenschaften eines bestimmten Stammes aus einer pathogenen Erregerart in einem bestimmten Wirt und unter definierten

Infektionsbedingungen. Der Virulenzgrad kann innerhalb der Stämme einer Art erheblich schwanken.

Die Beurteilung der Virulenz eines Virusstammes bereitet häufig Schwierigkeiten, da die Virulenz gleichfalls von Faktoren in Zelle und Wirt abhängig ist. Bei Virulenzprüfungen wird die Virulenz des applizierten Impfmateri als für den betreffenden Wirt oder ein vergleichbares Versuchstier in quantitativ genau abgestuften Infektionsversuchen geprüft, wobei Impfdosis und Applikationsart variieren können.

M a y r (35) prüfte die Abnahme der Virulenz des Virus der ansteckenden Schweinelähme nach Gewebekulturpassagen. Mit der 90/91. Kulturpassage ließ sich bei 6 - 8 Wochen alten Ferkeln mit unverdünntem Virusmaterial (Titer $10^{8,3}$ KID₅₀/ml) weder intracerebral noch durch Fütterung eine Krankheit erzeugen. In der niedrigen Passage erkrankten die Tiere nach intracerebraler Virusinjektion stets paralytisch.

Beim Virus der Maul- und Klauenseuche erfolgt die Virulenzprüfung durch kutane und intramuskuläre Applikation des zu untersuchenden Materials.

M a y r u.M. (39) führten Versuche mit Virusstämmen verschieden hoher Kälbernierenpassagen an 8 - 16 Monate alten Rindern durch. Nach Sakrifizierung der gesamten Zungenoberfläche wurde 1 ml Virusmaterial (Titer ca. $10^{5,6}$ KID₅₀/ml) mittels einer Pipette eingegeben. Während das Virus der 300. ENK-Passage noch zur Bildung kleiner Primärbläschen auf der Zunge führte, blieb beim Virus der 370. Kulturpassage jegliche Primärreaktion aus. Bei intramuskulärer Applikation des Virus der 210. Kulturpassage kam es zu einer generalisierten Klauenerkrankung. Nach Applikation des Virus der 300.- 370. Kulturpassage traten dagegen nur noch vereinzelt kleine Bläschen auf der Zunge und Mundschleimhaut auf, ohne daß das Allgemeinbefinden gestört wurde.

Es ist interessant, daß durch Dauerpassagen zuerst die Vermehrungsfähigkeit in Haut und Schleimhäuten nachläßt und erst später die in Muskelgeweben.

Die Neurovirulenz von Poliomyelitisvirusstämmen wird bei Affen geprüft. Dabei stellt die intracerebrale oder intraspinale Applikation den empfindlichsten Test dar. Ein von L w o f f (34) kälteadapt-

tierter Virusstamm wurde nach intracerebraler Applikation selbst in einer Dosis von $10^{6,0}$ PBE ohne Krankheitserscheinungen vertragen.

2.1.3.2. "In vivo"-Affinität für Zellen der natürlichen
Eintrittsporten bzw. für Zellen bestimmter Manifestationsorgane

Die unterschiedliche Affinität von Virusstämmen zu Zellen der natürlichen Eintrittsporten oder zu Zellen bestimmter Manifestationsorgane kann genetisch verankert sein und deshalb als Marker dienen. Attenuierten Viren fehlt oftmals die Haftfähigkeit und Affinität für Zellen des natürlichen Eintrittsortes oder für Zellen der Manifestationsorgane.

So konnten z.B. Huygelen u.M. (28) durch intranasale Applikation des attenuierten Rötelvirusstammes Cendehill 51 -im Gegensatz zum virulenten Stamm- bei Affen mit einer Dosis von $10^{3,7}$ KID₅₀ und bei Jugendlichen mit einer Dosis bis zu $10^{4,0}$ PBE keine Erkrankungen mehr auslösen.

Parkman u.M. (45) injizierten je einer Gruppe von Rhesusaffen intravenös virulente und attenuierte Rötelviren. Während der virulente Stamm zu einem Befall mehrerer Gewebe führte, ließ sich das attenuierte Virus nur in Milz und Lymphknoten nachweisen. Bei trächtigen Tieren ließ sich nur der virulente Stamm aus der Plazenta und dem Fötus isolieren.

Beim Gelbfiebertvirus unterscheidet man viscerotrope und neurotrope Stämme. Erstere führen zu dem klassischen Bild der Erkrankung mit besonderem Befall der Leber, die anderen zu einer meist tödlich verlaufenden Enzephalitis.

In einem Versuch von Theiler (55) wurden Affen mit einer Dosis von $10^{6,0}$ KID₅₀ subcutan mit einem der drei folgenden Stämme geimpft:

- virulenter Stamm Asibi = Ausgangsstamm
- attenuierter Stamm, >240 Kulturpassagen in Gewebekulturen von Mäuseembryonen, sog. 17 E
- attenuierter Stamm, >160 Kulturpassagen des Stammes 17 E in Gewebekulturen von Hühnerembryonen, denen vorher das Gehirn entfernt worden war, sog. 17 D

Der Ausgangsstamm zeigte eine hohe neurotrope und viscerotrope Affinität; 95 % der Tiere starb am 4. - 7. Tag p.i.. Stamm 17 E hatte stark an Virulenz eingebüßt. Stamm 17 D führte selten zu fiebrigen Reaktionen und war nur in geringen Mengen im Blut nachweisbar. Bei intracerebraler Injektion führte er zu einer Encephalitis ohne tödlichen Verlauf.

Ein weiteres sehr klassisches Beispiel für einen derartigen Marker stellen die Unterschiede zwischen lentogenen (avirulenten), mesogenen (schwach virulenten) und velogenen (stark virulenten) Newcastle-disease Virusstämmen dar. Diese Eigenschaft wird nachgewiesen durch die intracerebrale Inokulation von Eintagsküken und bestimmt durch den sog. neuropathischen Index. Stämme, deren Index nicht größer ist als 0,2, sind avirulent und für die Impfstoffproduktion geeignet (51).

2.1.3.3. "In vitro"-Adsorption an suspendierte Zellen

Die "in vitro"-Adsorption an bestimmte Zelltypen ist ein relativ stabiles Merkmal unterschiedlicher Virusstämmen. C a m p e l l (16) untersuchte in seinem Versuch die Adsorptionsfähigkeit eines MKS-Virusstammes, Typ A 119, an Nierenzellen erwachsener Mäuse. Hierfür wurden Virusmaterial und Zellsuspension (je 0,5 ml/Röhrchen) gemischt und bei 30°C inkubiert. Über 5 Stunden wurde in regelmäßigen Abständen ein Röhrchen des jeweiligen Gemisches entnommen, 4,0 ml BSS (10 % Rinderserum) hinzugefügt, zentrifugiert (225 g/5 Min.) und der Überstand auf nicht adsorbiertes Virus geprüft. Nach einer Stunde waren 1 - 5 %, nach 5 Stunden 0,3 - 0,8 % der Viruspartikel nicht adsorbiert. Die Adsorptionsrate war unabhängig von der Viruskonzentration. Die nicht adsorbierten Partikel blieben über weitere Passagen in ENK und anschließenden Adsorptionsversuchen in dieser Eigenschaft stabil.

Eine anschließend durchgeführte Infektiositätsprüfung mit den selektierten, nicht adsorbierbaren Viren erbrachte, daß eine intraperitoneale Injektion bei 7 - 10 Tage alten und bei erwachsenen Mäusen zu keiner Erkrankung, jedoch zu einem belastbaren Impfschutz führte. Diese Methode bietet sich unter Umständen zu einer Selektion attenuierter Virusstämme an.

2.1.3.4. Immunogenität

Die immunologischen Eigenschaften einer Virusspezies können von

Stamm zu Stamm starken Schwankungen unterworfen sein. So gibt es schwach immunisierende und stark immunisierende Virusstämme. Für eine Impfstoffherstellung eignen sich nur gut immunisierende Stämme, die diese Eigenschaft auch in Passagen beibehalten. Damit wird die immunisierende Eigenschaft eines Virusstammes zu einem besonders wichtigen Marker.

Ein Rückgang der Immunisierungsfähigkeit in bestimmten Versuchstieren kann als ein Unterscheidungsmerkmal für bestimmte attenuierte Virusstämme gegenüber ihren virulenten Stämmen dienen.

So untersuchten z.B. O x f o r d u.M. (41) die Antikörperbildung bei folgenden Rubellavirusstämmen:

- virulenter Stamm RA/27/3
- attenuierter Stamm Cendehill, Impfstamm
- attenuierter Stamm der 77. Kulturpassage

Je eine isolierte Gruppe weißer New Zealand Kaninchen (12 Wochen alt) wurde im Abstand von 4 Wochen mit 1,0 ml Virus (Titer $10^{3,0}$ KID₅₀/ml) intramuskulär geimpft. Alle 3 Wochen wurden Seren der Tiere auf HAH-Antikörper untersucht. Der virulente Stamm führte innerhalb von 8 Wochen zur Ausbildung von Antikörpern. Bei beiden Impfstämmen waren über 28 Wochen keine Antikörper nachweisbar. Dieser Marker blieb auch nach Passagen im natürlichen Wirt stabil.

2.1.3.5. Resistenz gegenüber spezifischen und unspezifischen Abwehrmechanismen

Das Verhalten von Virusstämmen gegenüber verschiedenen Abwehrmechanismen eines Organismus ist im einzelnen sehr unterschiedlich und kann als Marker herangezogen werden.

Die Abwehr gegenüber pathogenen Mikroorganismen stellt ein komplexes Geschehen dar.

Man hat grundsätzlich zu unterscheiden zwischen:

1. den spezifischen Abwehrmechanismen, die gegen bestimmte Erreger gebildet werden (Antikörper).
2. den unspezifischen Abwehrmechanismen, die sich gegen eine Vielzahl von Erregern richten und allgemein unter dem Begriff der Resistenz eines Organismus zusammengefaßt werden (26). Im Einzelnen sind als unspezifische Abwehrmechanismen eine Reihe von humoralen und zellulären Vorgängen bekannt, die z.T. normal im Organismus vorkommen, z.T. erst im Verlauf einer Infektion ent-

stehen. Zu ihnen zählen unter anderen Interferon, Fieber, eine pH-Verschiebung der Körperflüssigkeit und Inhibitoren.

2.1.3.5.1. IST-Marker (intraserotypische Differenzierung)

Das Verhalten von Virusstämmen im Serumdifferenzierungstest (IST) ist relativ stabil und kann deshalb ebenfalls als Marker benutzt werden. Der IST-Marker beruht darauf, daß ein Immuns Serum sein homologes Virus stärker neutralisiert als das heterologe Virus innerhalb derselben Art.

Die Versuche wurden mit Poliomyelitisviren aller drei Typen durchgeführt. Zur Herstellung von Immunsereen eignen sich Meerschweinchen, Kaninchen und Affen (20, 42, 49, 62). Nur plaquesselektierte reine Virusstämmen ermöglichen die Unterscheidung von Varianten. Als Vergleichsstamm diente der attenuierte Stamm CHAT. Zur Gewinnung von Immunsereen impften P l o t k i n u.M. (49) Meerschweinchen oder Kaninchen 3-mal im Abstand von 3 Wochen subkutan mit 1 ml unverdünnter Viruslösung, Stamm CHAT, Titer ca. $10^{7,0}$ PBE/ml. Das Serum wurde eine Woche nach der letzten Impfung durch Herzpunktion gewonnen und 30 Minuten bei 56° C inaktiviert. Nur die Seren mit einem Neutralisationsindex $> 1 : 100$ gegenüber dem homologen Virusstamm wurden für die Versuche verwendet.

D i w a n u.M. (20) impften Kaninchen 2 Wochen lang 5-mal die Woche intravenös mit 1 ml eines Poliomyelitisvirus und im Anschluß daran 1-mal pro Woche mit 3 ml intraperitoneal für 3 Wochen und gewannen das Serum eine Woche nach der letzten Impfung. Meerschweinchen impften sie 1-mal mit 4 ml intraperitoneal und 1 ml intramuskulär und entbluteten die Tiere 14 Tage danach.

Mit Hilfe des Plaquereduktionstestes wiesen P l o t k i n u.M. (49) nach, in wie weit der attenuierte Virusstamm CHAT und verschiedene andere heterogene Stämme durch das Anti-CHAT-Serum neutralisiert wurden.

Gemessen wurden Anzahl und Durchmesser der Plaques mit Immuns Serum und zu den Ergebnissen ohne Immuns Serum ins Verhältnis gesetzt.

Die Ergebnisse werden nach P l o t k i n u.M. (49) folgendermaßen ausgewertet. Am Tage der ersten sichtbaren stecknadelkopfgroßen Plaques des isologen Virusstammes wurden Gesamtzahl pro Platte (=N) und Durchmesser der drei größten Plaques (=D) gemessen und die Durchschnittswerte ermittelt.

D_s bzw. N_s ist der Durchmesser bzw. die Anzahl der Plaques unter Agar mit Immuns serum.

D_c bzw. N_c ist der Durchmesser bzw. die Anzahl der Plaques unter Agar ohne Immuns serum.

Der Wert des Immundifferenzierungstestes R_{IST} errechnet sich wie folgt:

$$R_{IST} = \frac{N_s}{N_c} \cdot \frac{D_s}{D_c}$$

Er drückt die Fähigkeit eines Serums aus, verschiedene Virusstämme des gleichen Typs zu neutralisieren.

Folgende Formel gibt dann Auskunft über das Verhältnis eines unbekannten Virusstammes zu dem isolierten Vergleichsstamm:

$$y \% = \frac{R_{IST} (x) - R_{IST} (CHAT, isolat)}{R_{IST} (heterolog) - R_{IST} (CHAT, isolat)}$$

$R_{IST} (x)$ steht für den unbekannten Virusstamm

y gibt den Relationswert in % an

Auswertung des y -Wertes in Relation zum Vergleichsstamm:

$y < 1/3$ bei homologem Virusmaterial

$y > 2/3$ bei heterologem Virusmaterial

$y > 1/3, < 2/3$ Zwischenstellung zwischen heterolog und homolog

2.1.3.5.2. Resistenz gegenüber Interferon

Ein besonders guter biologischer Marker ist das Verhalten verschiedener Virusstämme gegenüber Interferon. Besonders attenuierte Virusstämme scheinen gegenüber Interferon empfindlicher zu sein als virulente Stämme.

Neben der Empfindlichkeit gegenüber Interferon unterscheiden sich verschiedene Virusstämme auch in ihrer Fähigkeit Interferon zu bilden.

Auch dieses Verhalten läßt sich als Marker heranziehen.

Sellers (52) untersuchte die Interferonproduktion bei virulenten und in Küken attenuierten MKS-Virusstämmen, Typ O. Zur Gewinnung von Interferon wurden Rinderzungenepithelkulturen (RZE) in Rollerdrums à 2 ml Medium mit 0,2 ml einer Virusverdünnung (Titer

$10^{4,3}$ ID₅₀/Kultur, bzw. ca. 1 Maus ID₅₀/500 Zellen) beimpft und bei 37° C inkubiert. Je 3 bis 4 Kulturen wurden nach 18, 42, 66 und 90 Stunden geerntet. Die eine Hälfte der Ernte wurde auf freies Virus titriert, die andere für das Interferonausgangsmaterial verwendet. Hierfür wurde der pH des Mediums für 24 Stunden mit 0,25 ml n-HCl/3 ml Überstand auf 2 und später mit n-NaOH auf 7 eingestellt. Zur Feststellung des Interferontiters erhielten 3 Roller-drums mit RZE 0,5 ml Interferonausgangsmaterial/1,5 ml Medium. Sie wurden nach 24 Stunden bei 37° C mit $10^{3,3}$ PBE eines Stomatitis vesicularis Stammes (S.V.), Stamm Indiana C, beimpft und erneut 18 Stunden bei 37° C inkubiert. Der Interferontiter stellt die Titerdifferenz des S.V.-Virus in der überstehenden Flüssigkeit der Röhrchen mit Interferon und den Kontrollen ohne Interferon dar.

Die Vermehrungsquote war bei den virulenten Virusstämmen größer als bei den attenuierten, umgekehrt provozierten diese eine stärkere Interferonbildung. Das attenuierte Virus mußte sich aber erst bis zu einem Titer von $10^{5,0}$ Maus ID₅₀ vermehrt haben, ehe eine meßbare Interferonproduktion auftrat. Später blockierte das gebildete Interferon die Virusvermehrung.

In einem weiteren Interferonversuch von De Maeyer u.M. (19) mit virulentem Masernvirus und in Hühnerembryozellen attenuiertem Virus, Stamm Edmonston, diente als Vergleichstamm Sindbis-Virus, Stamm AR 339. Als Kultur wurden primäre humane Amnionzellen verwendet. Ein zytopathischer Effekt trat in den Kulturen bei beiden Stämmen gleichzeitig auf, eine weitere Ausbreitung war aber bei dem attenuierten Stamm verlangsamt. Der Interferontiter lag bei diesem zwei Mal höher als beim virulenten Stamm.

2.1.3.5.3. ret-Marker (reproductive capacity at high temperature, Vermehrungsfähigkeit bei hohen Temperaturen)

Die Vermehrungsintensität attenuierter und virulenter Virusstämme kann in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur erheblich schwanken.

Untersuchungen über den ret-Marker wurden bei Inkubationstemperaturen von 40° C durchgeführt. "In vivo" scheinen virulente Virusstämme gegenüber einer Erhöhung der Körpertemperatur infolge einer Infektion relativ stabiler zu sein als attenuierte Stämme (34). Die "in vitro" Versuche führen zu ähnlichen Ergebnissen.

C a r p u.M. (17, 18) prüften attenuierte und virulente Poliomyelitisvirusstämme aller drei Typen in MK-Kulturen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt und zeigen die Vermehrungsfähigkeit einzelner Stämme bei 40° C.

Die virulenten Stämme vermehrten sich in diesem Versuch bei 40° C unverändert gut, während die attenuierten Stämme an Titer verloren.

Virusstämme	Typ	Anzahl der Plaques nach Inkubation bei 40° C			Wert r
		0 Std.	18 Std.	30 Std.	
CHAT att.	1	31	4	-	0,13
Mahoney vir.	1	58	129	-	2,30
P-712 att.	2	29	4	0	0,14
MEF-1 vir.	2	155	156	146	1,00
Fox att.	3	63	0	nicht	0,00
Habel vir.	3	73	92	untersucht	1,26

Tabelle 1: Anzahl der Plaques attenuierter und virulenter Poliomyelitisstämme in MK-Kulturen nach Inkubation bei 40° C (nach C a r p u.M. (17))

Der Virulenzgrad eines Stammes läßt sich nach den gleichen Autoren (17, 18) mit Hilfe des rct-Markers im "limited thermal exposure test" (LTE-Test) berechnen. Hierfür wurden beimpfte Kulturen bei 37° C und 40° C inkubiert. Um zu prüfen, welche Inkubationszeit für einen Vergleich von rct-Charakteren verschiedener Virusstämme die geeignetste sei, wurden in bestimmten Abständen Schälchen aus dem 40° C Inkubator entnommen und weiter bei 37° C gehalten. In diesem Versuch erwiesen sich 18 Stunden als geeignet.

Die Resultate wurden ausgedrückt als limited thermal exposure ratio (r).

r wird berechnet aus dem Verhältnis zwischen der Anzahl von Plaques, die bei 37° C entstehen, und der Anzahl von Plaques, die während

18 Stunden bei 40° C entstanden. Der Wert schwankt für einen einzigen Virusstamm von Experiment zu Experiment beträchtlich, so daß es ratsam ist, für jeden Versuch die Werte r eines Standard attenuierten und eines Standard virulenten Stammes nach folgender Formel mit einzubeziehen:

$$R = \frac{X_r - A_{or}}{V_{or} - A_{or}} \cdot 100$$

R = Wert des fraglichen Stammes in %

X_r = Wert r des fraglichen Stammes

A_o = Wert r des Standard attenuierten Stammes

V_o = Wert r des Standard virulenten Stammes

Auswertung: $R = 0 - 30$ für attenuierte Stämme

$R = 30 - 65$ zwischen attenuierten und virulenten
liegend

$R = 65 - 100$ für virulente Stämme

2.1.3.5.4. d-Marker (Vermehrungsfähigkeit unter saurem Agar)

Die Vermehrungsfähigkeit bzw. das Plaquebildungsvermögen unter saurem Agar ist für einige Virusstämme charakteristisch und kann als Marker dienen.

Vogt und Dulbecco (59) beschreiben sog. "d"-Virusstämme bei Poliomyelitis und ihre Eigenschaften, unter leicht saurem Agar keine oder nur verzögert Plaques auszubilden. Nach ihrer Meinung sind die optimalen Lebensbedingungen einiger Virusstämme an einen bestimmten pH-Bereich gebunden. Dabei scheinen die virulenten Virusstämme (d^+) unempfindlicher gegen pH-Verschiebungen zu sein als die weniger virulenten Varianten (d).

Die Autoren untersuchten virulente und attenuierte Virusstämme aller drei Poliomyelitisvirustypen auf MK-Kulturen. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte durch Änderungen des Bicarbonatgehaltes im Agar und des CO_2 -Gehaltes im Inkubator. Die Titer wurden am dritten Tag p.i. oder sobald mehr als 50 % der Anzahl zu erwartender Plaques unter alkalischem Agar ausgebildet waren, abgelesen.

Eine Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich zeigte keine Unterschiede in der Plaquebildung. Unterhalb von pH 6,9 war die Virusausbeute bei "d"-Virusstämmen deutlich verringert (59).

Von diesem Merkmal kann aber nur bedingt auf die Virulenz eines Virus geschlossen werden, da Rückmutationen der "d"-Stämme in Richtung d^+ der "wilden" Stämme beobachtet wurden, die in ihrer Virulenz kaum gesteigert waren (24). Außer vom pH-Wert scheinen diese Eigenschaften von gewissen Substanzen im Agar wie z.B. Polysaccharidsulfaten abhängig zu sein (1, 54).

2.1.3.5.5. Resistenz gegenüber Inhibitoren, besonders Seruminhibitoren

Inhibitoren bestimmter Tierarten wirken unterschiedlich auf bestimmte Viren. Die Resistenz eines Virus gegenüber diesen natürlichen, wirtseigenen Substanzen kann als ein Marker angesehen werden.

Chemisch handelt es sich bei den Seruminhibitoren größtenteils um thermolabile Proteine, Mucoproteine, Mucopolysaccharide und Lipide. Ihre Wirkungsweise ist noch nicht einwandfrei geklärt. Eventuell bestehen Zusammenhänge zwischen diesen antikörperähnlichen Aktivitäten und den γ -Globulinen (7, 48, 56).

Das experimentelle Einbringen von β -Inhibitoren des Rinderserums in die Allantoishöhle von Eiern führt nach Verimpfung hoher Konzentrationen von Influenzaviren zu deren Neutralisation, was dann in der Hämagglutinationshemmungsreaktion nachgewiesen werden kann. Die inhibitorresistenten Partikel stellen das Ausgangsmaterial einer neuen Viruspopulation dar, sog. R_{Ei} -Linien. Eine ähnliche Selektion von R_{Maus} -Linien gelingt nach Passagen in Mäusen. Beide Stämme (R_{Ei} und R_{Maus}) führen in Eiern und bei intranasaler Applikation im Respirationstrakt der Maus zu schweren Läsionen und hohen Infektiositätstitern im Gegensatz zum Ausgangsstamm, dessen Vermehrung und Ausbreitung in der Maus durch Inhibitoren gehemmt wird (40).

2.1.3.6. Wirtsspektrum auf zellulärer Ebene

Das Verhalten von Virusstämmen auf zellulärer Ebene kann gute Aufkünfte über ihre biologischen Eigenschaften geben. Es stellt einen ganzen Markerkomplex dar, da hierfür unterschiedliche biologische Eigenschaften zusammenwirken. Das Verhalten der Virusstämme in den verschiedenen Wirtssystemen hängt neben den Eigenschaften des Virus

von anderen beteiligten Faktoren ab. Es kommt hinzu, daß sich Virusstämme, die sich z.B. anfangs in bestimmten Zellkulturen nicht vermehren, durch bestimmte Kunstgriffe an diese Zellen adaptieren lassen. Will man das Kulturspektrum und die Vermehrungsintensität in den einzelnen Zellen als Marker benutzen, so darf man hierfür immer nur das Verhalten bei Erstpassagen auswerten. So wurden beispielsweise von B u y n a c k u.M. (15) attenuierte und virulente Mumpsviren in verschiedenen Zellkulturen untersucht. Dabei wurden folgende Stämme verwendet:

- attenuierter Stamm Lot 136 A, 16 Kulturpassagen in Hühnerembryonen und Hühnerembryokulturen
- attenuierter Stamm Lot 137 B, 17 Kulturpassagen in den gleichen Geweben wie oben (beide Stämme stammen von dem virulenten Stamm Jeryl Lym ab)
- virulenter Stamm ABC

Die Erreger wurden in 10-er Potenzen/0,1 ml bei 36° C titriert.

Wie aus der Tabelle 2 zu ersehen ist, erreichen die attenuierten Stämme in Kulturen von Hühnerembryonen, in denen auch die Anzüchtung erfolgte, höhere Titer als der virulente Stamm, der dagegen ein breiteres Kulturspektrum in heterogenen Zellsystemen aufwies.

Kulturen	Nachweismethode	Virusstämme		
		Lot 137	Lot 136	ABC
Prim. KN	CPE-Titer KID ₅₀	2,5	2,8	4,0
Prim.hum. Amnion	CPE-Titer KID ₅₀	< 0	< 0	3,8
Hela	CPE-Titer KID ₅₀	3,3	3,3	4,0
Hühnerembryonen	CPE-Titer KID ₅₀	4,3	4,3	2,8

Tabelle 2: Vergleich verschiedener Mumpsvirusstämme in Zellkulturen (nach B u y n a c k u.M. (15))

K a n d a u.M. (31) untersuchten attenuierte und virulente Polio- myelitisvirusstämme in MS- und MK-Kulturen hinsichtlich Titer und

Plauebildungsvermögen. Die Vermehrungsfähigkeit von Poliomyelitisviren in MS-Zellen bezeichneten sie als MS-Marker.

Der MS-Charakter wurde bestimmt nach dem Durchmesser der Plaques auf MS-Zellkulturen.

MS bei Plaques $\phi < 1$ mm

MS⁺ bei Plaques $\phi > 1$ mm

Der Flaquetest wurde unter einer möglichst dünnen Agarschicht bei hohem Gehalt an Neutralrot (1 %) durchgeführt. 0,2 ml Virusmaterial pro Kulturflasche wurden 50 Minuten adsorbiert und mit 4 ml MS-Agar überschichtet. Gleichzeitig wurde der d-Charakter und die Neurovirulenz bei Affen mit 10^{5,0} PBE intracerebral getestet.

Die Ergebnisse der Titrationen und der MS- und d-Charakter sind der folgenden Tabelle 3 zu entnehmen.

Virusstamm	Titer log ₁₀ KID ₅₀		in MS-Kulturen		in MK-Kulturen		Charakter	Analysen
	MK	MS	PBE/ml	Plaue ø	PBE/ml	Blaue ø	MS d	
<u>Typ 1:</u>								
Mahoney vir.	7,5	6,2	7,2	3 - 5	8,4	14 - 18	MS ⁺ d ⁺	2/2
LSc att.	7,3	3,7	5,0	0 - 1	8,0	14 - 17	MS d	0/2
Sapin's LSc att.	7,0	4,0	0	0	7,8	12 - 15	MS d	0/8
<u>Typ 2:</u>								
MEF ₁ vir.	7,0	5,8	7,0	3 - 5	8,0	14 - 16	MS ⁺ d ⁺	2/2
YSK att.	6,7	3,3	4,8	0 - 1	7,3	14 - 16	MS d	0/2
Sapin's P. 712 att.	6,5	3,5	0	0	7,3	9 - 11	MS d	-
<u>Typ 3:</u>								
P 24 vir.	7,0	5,5	7,2	4 - 6	8,0	14 - 16	MS ⁺ d ⁺	2/2
Saukett vir.	7,0	3,0	5,2	0 - 1	7,7	13 - 15	MS d ⁺	0/2
Leon att.	6,8	3,0	0	0	7,3	13 - 15	MS d	0/2
Sapin's Leon att.	6,8	3,3	0	0	7,5	10 - 12	MS d	-

Tabelle 3: Vergleich mehrerer Poliomyelitisstämme in MK- und MS-Kulturen

2.1.4. PHYSIKALISCHE UND CHEMISCHE MARKER

Physikalische und chemische Marker eines Virusstammes sind genetisch fixierte Merkmale, die sich in dem Verhalten des isolierten Virus gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen äußern und sich gut nachweisen lassen.

Am einfachsten ist das Verhalten gegenüber verschiedenen Inaktivierungsverfahren zu messen. Für die meisten Inaktivierungsprozesse ist ein m.o.w. deutlicher biphasischer Reaktionsablauf charakteristisch. Die zuerst steil abfallende Inaktivierungskurve deutet auf eine rasche Inaktivierung der sensiblen Viruspartikel hin; es folgt die langsamere Reaktion der gegen das jeweilig eingesetzte Inaktivierungsmittel resistenteren Partikel, die sich in einer flach verlaufenden Kurve ausdrückt. Dieser biphasische Reaktionsablauf ist der Beweis für die Heterogenität einer Viruspopulation, in der es zu einer unterschiedlichen Reaktion mit stabilisierenden und inaktivierenden Substanzen kommt. Es wird nicht jede infektiöse Einheit mit gleicher Wahrscheinlichkeit in einer bestimmten Zeit inaktiviert (2,50,51,57). Gleichzeitig wird die Auffassung vertreten, daß die Inaktivierung von Viren sich in zwei Komponenten aufteilt, entsprechend zweier wirksamer Formen, in denen die Nukleinsäure vorliegen soll (2,38).

2.1.4.1. T-Marker (Thermoresistenz gegenüber 56°C)

Dieser Marker stellt ein rein physikalisches Merkmal dar und gibt Auskunft über die Resistenz eines Virus gegenüber Temperaturen von 56°C. Im Allgemeinen zeigen attenuierte Virusstämme eine größere Labilität gegenüber höheren Temperaturen als ihr virulente Ausgangsstämme. Dies wird aus den folgenden Versuchen ersichtlich.

M a y r u. M. (38) verglichen einzelne ENS-Passagen des Teschen-Virusstammes Konratice hinsichtlich ihrer Inaktivierungsgeschwindigkeit bei einer Inkubation von 56°C. Die Ansatzmenge betrug 200 ml, der Titer vor dem Versuch $10^{7,5} - 10^{8,5}$ KID₅₀/0,1 ml. In regelmäßigen Abständen entnommene Proben wurden auf ENS titriert.

Wie die Ergebnisse in Tabelle 4 zeigen, war der attenuierte Stamm bereits nach 30 Minuten bei 56°C fast vollständig inaktiviert, während der virulente Ausgangsstamm noch einen Titer von $10^{4,5}$ KID₅₀ besaß.

Teschenvirus Stamm Konratice	Titer, $\log_{10}$ KID ₅₀ /0,1 ml nach einer Inkubationszeit bei 56°C von		
Anzahl der KP	0 Min.	30 Min.	60 Min.
4.	7,25	4,50	1,75
220.	7,50	1,50	0,75
425.	7,50	- 0,25	- 0,375

Tabelle 4: Thermoresistenz von Teschenvirus, Stamm Konratice, verschiedener Passagen (nach M a y r u.M. (38))

Der gleiche Versuch wurde von B e n g t s s o n u.M. (9) mit MKS-Virusstämmen durchgeführt.

Bei den attenuierten Virusstämmen der Typen A und O kam es nach 15 Minuten bei 56°C zu einem signifikanten Titerverlust (siehe Tabelle 5). Bei den attenuierten und virulenten Stämmen von Typ C dagegen waren keine so deutlichen Titerunterschiede vorhanden; somit ist dieser Marker für diesen Typ nicht verwendbar.

MKS-Virus- stämme	KP in ENK	Titer, $\log_{10}$ PBE/0,1 ml nach einer Inkubationszeit bei 56°C von	
		0 Min.	15 Min.
Typ A ₄ vir.	711	6,6	5,0
Typ A ₄ att.		6,9	1,0
Typ C vir.	357	6,6	4,7
Typ C att.		6,1	3,0
Typ O ₃ vir.	718	6,6	5,0
Typ O ₃ att.		6,2	< 1,0

Tabelle 5: Thermoresistenz verschiedener MKS-Virusstämmen bei 56°C
(B e n g t s s o n u.M. (9))

2.1.4.2. Sedimentation in D_2O-H_2O Dichtegradienten

Die Sedimentationsgeschwindigkeit in D_2O-H_2O Dichtegradienten kann für bestimmte attenuierte und virulente Virusstämme unterschiedlich sein und daher als Marker dienen.

Ein Versuch wurde von Mayr u.M. (38) mit Teschenvirusstämmen verschiedener ENS-Passagen durchgeführt. Der D_2O-H_2O Gradient (pH 7,6) war so eingestellt, daß ein einheitliches Material der Dichte 1,34 mit konstanter Geschwindigkeit sedimentieren sollte. Das Virusmaterial, 1 : 10 verdünnt, wurde in einer Zentrifugenzelle mit sektorenförmigem Sedimentationsraum in einer 3 mm breiten Zone über den Gradienten geschichtet. Nach Ultrazentrifugation bei 4,5 - 5°C wurden mit einer gebogenen Kapillare 6 - 8 Fraktionen entnommen und biologisch getestet. Bei der 2. und 279. Passage trat der höchste Titer in der 5. Fraktion von oben aus gerechnet auf. Beim hochpassierten Virus war jedoch in der vorhergehenden Fraktion mehr infektiöses Virus vorhanden als beim niedrigpassierten. Das würde bedeuten, daß die Sedimentationskonstante beim hochpassierten Virus etwas kleiner ist als beim niedrigpassierten. Bei genauen Messungen fanden die Autoren, daß das hochpassierte Virus eine etwa 7 Svendberg kleinere Sedimentationskonstante besitzt.

2.1.4.3. Sedimentation im CsCl Dichtegradienten

Ebenso wie bei der Sedimentation in D_2O-H_2O Dichtegradienten zeigen attenuierte und virulente Virusstämme ein unterschiedliches Verhalten in Dichtegradienten von CsCl. Parker u.M. (44) untersuchten dieses Verhalten bei Wesselsbron Virusstämmen folgender Passagen:

-virulenter Stamm, niedrige KP/FLK, d.h. insgesamt 12 KP in Lammnierenkulturen

-virulenter Stamm, niedrige KP/SMB, d.h. zusätzlich zu den FLK-Passagen 4 - 8 KP im ZNS 3 - 4 Tage alter Mäuse

-attenuierter Stamm, hohe KP/FLK, insgesamt 110 KP auf FLK

-attenuierter Stamm, hohe KP/SMB, d.h. zusätzlich zu FLK 4 - 8 KP in SMB

Das Untersuchungsmaterial wurde bei 0 - 4°C während drei Stunden bei 30 000 U/min. zentrifugiert. Anschließend wurden die einzelnen Fraktionen titriert. Die virulenten Stämme hatten einen maximalen Titer bei der Dichte 1,225 - 1,238 g/ml. Die attenuierten Stämme dagegen setzten sich anscheinend aus zwei Komponenten zusammen, die ihre maximalen Titer in zwei verschiedenen Dichtebereichen hatten. Die Titer der hohen KP/SMB lagen in beiden Fraktionen annähernd gleich hoch, waren aber stets auch höher als diejenigen der hohen KP/FLK (siehe Tabelle 6).

Virusstamm Wesselsbron	maximaler Infektionstiter ($\log_{10} \text{ID}_{50}$)/Dichte g/ml	
niedrige KP/FLK	3,0 / 1,238	
niedrige KP/SMB	< 4,0 / 1,225	
hohe KP/FLK	2,5 / 1,14	< 4,5 / 1,25
hohe PK/SMB	4,0 / 1,136	4,5 / 1,25

Tabelle 6: Die Dichte verschiedener Wesselsbronvirusstämme in CaCl
(nach P a r k e r u.M. (44))

2.1.4.4. Sedimentation in Dichtegradienten von Dextransulfat (DS) und Diäthylaminoäthylen-Dextran (DEAE-Dextran)

Poliomyelitisviren sedimentieren unterschiedlich stark in Dichtegradienten von DS und DEAE-Dextran. Dieses Verhalten ist teilweise abhängig vom pH-Wert der einzelnen Gradienten und beruht auf der unterschiedlichen Affinität der Viruspartikel zu Polyionen.

B e n g t s s o n u.M. (7,11) führten diesen Versuch mit dem attenuierten Poliomyelitisvirus LSc 2ab und dem virulenten Stamm E 2o6 (beide Typ1) durch. Die verwendeten Gradienten (4,0 ml) waren nahezu linear mit DS-Konzentrationen von 0,01 - 0,043 g/ml und mit NaJ als Stabilisator in Konzentrationen von 0 - 0,018 g/ml. Die DEAE-Gradienten waren linear in DEAE-Dextran Konzentrationen von 0,01 - 0,08 g/ml. Bei DS und DEAE-Dextran wurde der pH-Bereich von 5 - 8 mit 1/15 m-Phosphatpuffer und bei DEAE-Dextran zusätzlich noch auf pH 8,0 mit 0,05 m-Tris-HCl Puffer eingestellt. 0,1 ml Virusmaterial wurden über den Gradienten geschichtet und für 90 Minuten bei 39 000 U/min. zentrifugiert.

In DS bei pH 7,0 sedimentierte der Stamm LSc 2ab langsamer als E 2o6, ebenso in DEAE-Dextran bei pH 8,0. Bei pH 7,0 in DEAE-Dextran war der Unterschied zwischen beiden Stämmen nicht signifikant. Die Sedimentation des E 2o6 war unabhängig vom pH-Wert. In einem Gradienten in NaJ ohne DS sedimentierten beide Stämme gleich schnell; DS und NaJ wirkten in den genannten Konzentrationen nicht inaktivierend.

2.1.4.5. pH-Marker (Säurestabilität)

Die Resistenz eines Virusstammes im sauren pH-Bereich kann als rein chemischer Marker verwendet werden. Im Allgemeinen zeigen attenuierte Stämme eine größere Labilität gegenüber einem niedrigen pH als virulente Stämme.

B e n g t s s o n u.M. (9) untersuchten attenuierte und virulente MKS-Virusstämme der Typen O, A und C auf ihre Resistenz gegenüber einem pH von 6,5. Die Stämme wurden hierfür in 10-er Potenzen mit 0,1 m-Zitrat-Phosphatpuffer pH 6,5 verdünnt und für 10 Min. bei Raumtemperatur gehalten. Für die Kontrollen diente der gleiche Puffer mit einem pH von 7,1. Die Inaktivierung wurde durch Verdünnen der Proben in 10-er Potenzen mit 0,2 m-Trispuffer pH 7,5 unterbrochen.

Die attenuierten Stämme reagierten sensibler als ihre Ausgangsstämme. Am empfindlichsten reagierte der attenuierte Stamm Typ A₄. Die Unterschiede zwischen den Stämmen der Typen C und O waren nicht so signifikant (Tab.7).

Virusstämme	Titer in log ₁₀ PBE/0,1 ml		
	pH 7,1	pH 6,5	Differenz
Typ A ₄ virulent	7,0	5,6	1,4
Typ A ₄ attenuiert	7,1	< 2,0	> 5,1

Tabelle 7: Inaktivierung eines virulenten und attenuierten MKS-Virusstammes, Typ A, bei pH 6,5
(nach B e n g t s s o n u.M. (9))

2.1.4.6. Resistenz gegenüber Formalin

Formalin führt bei einem großen Teil von Virusstämmen zu einer Inaktivierung. Innerhalb einzelner Virustypen lassen sich resistendere Stämme von labileren unterscheiden, wobei wieder die attenuierten oftmals labiler erscheinen. Die Inaktivierung von Teschenviren verschiedener Passagen bei 37°C und pH 7,3 bei einer Formalinkonzentration von 1 : 5 000 wurde von M a y r u.M. (38) untersucht. Um unspezifische Eiweißreaktionen auszuschließen, wurden die Virusproben zuvor mit 10 %-igem Chloroform ausgeschüttelt. In bestimmten Abständen wurden Proben entnommen und das Formalin mit einem Äquivalent Natriumbisulfit abgebunden und gegen physiologische Salzlösung (NaCl) dialysiert.

Der virulente Stamm war gegenüber der Formalininaktivierung stabiler als der avirulente Stamm (Tab. 8).

Teschenvirus Stamm Konratice	Kulturpassage	Titer $\log_{10} \text{KID}_{50}/0,1 \text{ ml nach Formalininaktivierung von } \dots \text{ Std.}$		
		0	2	3
virulenter Stamm	2. KP	> 5,5	5,5	> 3,5
attenuierter Stamm	279. KP	> 7,5	3,5	0,5

Tabelle 8: Formalininaktivierung von Teschenvirus verschiedener KP
(nach M a y r u.M. (38))

2.1.4.7. A-Marker (Thermoresistenz in Gegenwart von Al^{+++})

Der A-Marker gibt Auskunft über die Thermoresistenz bestimmter Virusstämme gegenüber Temperaturen von 50°C in Gegenwart von Al^{+++} .

Es ist bekannt, daß manche Poliomyelitisvirusstämme gegen höhere Temperatureinflüsse in leicht saurem Milieu stabiler sind als in neutralem, und daß diese Reaktionen von den Anionen der organischen oder anorganischen Säuren abhängig sind (2).

W a l l i s u.M. (60) gelang die Selektion thermoresistenter Poliomyelitisviren aus einer heterogenen Population. Hierfür erhitzen sie den virulenten Stamm Mahoney, Typ 1, in 10 mM- AlCl_3 -Lösung und Aqua dest. während 15 Minuten auf 50°C . Der jeweils resistente Anteil wurde in MK-Kulturen passiert und erneut in Aqua dest. oder AlCl_3 -Lösung auf 50°C erhitzt. Insgesamt wurden 10 derartige Selektionspassagen durchgeführt. Jede Passage wurde auf ihre Infektiosität titriert und jeweils auf ihre Thermoresistenz gegenüber 50°C in Aqua dest. und AlCl_3 getestet. Die Selektion eines thermoresistenten Virusstammes gelang in diesem Versuch nur in Gegenwart von Al-Ionen. Gleichzeitig war dieser Stamm für Affen avirulent. Eine Dosis von $10^{8,0}$ PBE, i.o. verabreicht, wurde ohne klinische Symptome vertragen. Die Titrationsergebnisse sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

Virusstamm Mahoney Anzahl der KP	Titer $\log_{10}$ FBE/ml				
	unerhitzte Kontrolle	Selektionspassage in H_2O		Selektionspassage in $AlCl_3$	
		erhitzt in		erhitzt in	
		H_2O	$AlCl_3$	H_2O	$AlCl_3$
1.	7,4 - 7,5	3,2	2,3	3,3	3,5
3.	7,3 - 7,5	2,9	1,8	2,8	7,1
10.	7,4	3,1	2,4	3,4	7,2

Tabelle 9: Thermoresistenz von Poliomyelitisstämmen nach Selektion in H_2O oder $AlCl_3$ -Lösung bei $50^\circ C$ (nach Wallis u.M. (60))

Um verschiedene attenuierte und virulente Poliomyelitisviren, Typ 1, auf ihre Thermoresistenz in Gegenwart von Al^{+++} zu prüfen, verdünnten Bengtsson u.M. (10) die Stämme erst 1 : 5 in Aqua dest., dann 1 : 2 in 25 mM- $AlCl_3$ und führten anschließend die Inaktivierung bei $50^\circ C$ für 5 Minuten durch.

Alle untersuchten virulenten Stämme waren thermolabil, die attenuierten Stämme dagegen verhielten sich unterschiedlich (siehe Tabelle 10). Dieser Marker kann also nicht generell zur Differenzierung von Impfviren und ihren Ausgangsstämmen herangezogen werden.

Poliomyelitis- Virusstämme	Titerdifferenz in $\log_{10}$ Einheiten nach Inkubation bei $50^\circ C$ für 5 Minuten mit und ohne $AlCl_3$	A Charakter
virulent: E 206	0,1	+
1423/53	0,2	+
attenuiert: LSc 2ab	2,9	-
Baylor	1,5	±
CHAT 33	0,0	+

Tabelle 10: Thermoresistenz attenuierter und virulenter Poliomyelitisstämme, Typ 1, in Gegenwart von Al^{+++} (nach Bengtsson u.M. (10))

2.1.4.8. Aa-Marker (Adsorption an Al^{+++})

Der Aa-Marker läßt sich definieren als die Fähigkeit eines Virus, sich quantitativ an ein Aluminiumsalz ($AlCl_3$) oder Aluminiumhydroxydgel zu adsorbieren. Dabei werden die adsorbierten Stämme als Aa, die nicht adsorbierten als Aa^+ bezeichnet.

W a l l i s u. M. (61) untersuchten attenuierte und virulente Poliomyelitisstämme aller drei Typen in ihrem Verhalten gegenüber verschiedenen Konzentrationen von $AlCl_3$ in einer gepufferten Salzlösung von Bikarbonatphosphat. Hierfür wurden 2,7 ml Virusmaterial (Titer $10^{5,0}$ PBE/ml) und 0,3 ml Aqua dest. oder verschiedene Konzentrationen der Salzlösung unter mehrmaligem Schütteln für 15 Minuten bei $37^\circ C$ inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2 000 U/min. für 5 Minuten wurde der Überstand titriert.

In Abhängigkeit von der Salzkonzentration wurden bevorzugt die attenuierten Virusstämme speziell vom Typ 1 von $AlCl_3$ adsorbiert. Bei einer Al^{+++} -Konzentration von > 20 mM wurden auch die virulenten Virusstämme aller drei Typen ausgefällt. Mit dieser Methode lassen sich aus einem Gemisch virulente und attenuierte Viruspartikel trennen; sie läßt aber nur die Unterscheidung von Virusstämmen innerhalb eines Virustyps zu.

Mit Aluminiumhydroxydgel als Adsorbens wird die unterschiedliche Bindungskapazität von Virusstämmen festgestellt, indem die Elutionsrate des adsorbierten Virus in Abhängigkeit von der Molarität des Phosphatpuffers bestimmt wird.

T h o m s s o n u. M. (58) verwendeten für ihre Versuche ^{32}P -markierte Poliomyelitisviren, den attenuierten Stamm Leon 12ab und wilde Stämme des gleichen Serotyps 3. In 6 Röhrchen wurden 2 ml des ^{32}P -markierten Virus, verdünnt in Acetat-Puffer pH 5,5, mit 0,5 ml Aluminiumhydroxyd (1/6 in Aqua bidest.) vermischt, 15 Minuten bei Raumtemperatur adsorbiert und zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt. Zu jedem Röhrchen wurden dann 3,0 ml Phosphatpuffer in steigenden Konzentrationen hinzugefügt und für 15 Minuten im Wasserbad bei $25^\circ C$ gehalten. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das eluierte Virus in Mengen von 1 ml in Aluminiumschälchen getan, getrocknet und auf Radioaktivität mit Hilfe eines Meßthangsverfahrens geprüft.

Das Verhalten des Virusstammes war charakterisiert durch die Phosphatkonzentration des Puffers bei pH 7,5, die zur 50 %-igen Elution bzw. Adsorption des Virus oder der virusgebundenen Radioaktivitäten führte.

Der attenuierte Stamm Leon 12ab eluierte bei einer niedrigeren Phosphatkonzentration als der "wilde" Stamm 1658/63. Unterschiede auch zu an-

deren in der Praxis isolierten Stämmen ermöglichten eine Identifizierung des untersuchten Materials.

Die Adsorption an Aluminiumhydroxydgel ergab bei Poliomyelitis, daß innerhalb des gleichen Serotyps mehr als zwei, bei Typ 3 z.B. bislang insgesamt 7, verschiedene Verhaltenstypen unterscheidbar sind (56).

2.1.4.9. e-Marker (chromatographisches Verhalten gegenüber DEAE-Zellulose-Säule)

Der e-Marker bezeichnet die Affinität eines Virusstammes zu einer Diäthylaminoäthyl-Zellulose-Säule. Gleichzeitig scheint dieser Marker auch Hinweise auf den Virulenzgrad eines Virus zu geben, wie aus folgendem Versuch ersichtlich ist.

Die Unterscheidung attenuierter und virulenter Poliomyelitistypen, Typ 1, hinsichtlich ihrer Affinität zur DEAE-Zellulose-Säule wurde von H o d e s u.M. (27) untersucht. Hierfür wurden 2 ml eines durch Ultrazentrifugieren in 2,3 ml 0,02 m-Phosphatpuffer (pH 7,1) konzentrierten Poliomyelitismaterials auf eine DEAE-Zellulose-Säule gebracht. Zur Wiedergewinnung nicht adsorbierter Viruspartikel wurden 2 ml eines Phosphatpuffers 10 mal zu der Säule zugefügt und entsprechend 10 Proben (je 2 ml) für die weitere Titration in Gewebekulturen (MK) entnommen.

Der virulente Mahoney Stamm konnte zu 94 % zurückgewonnen werden, mit einer maximalen Menge in der 4. Fraktion. Der attenuierte Stamm LSc 2ab konnte dagegen nur zu insgesamt 0,8 % in den Fraktionen nachgewiesen werden, mit einer maximalen Menge von 0,1 % in der 6. Probe. Zusätzlich wurde ein Virusstamm getestet, der von Sapin aus dem Stuhl eines Kindes 19 Tage post vacc. mit LSc 2ab isoliert worden war. Mit 10 % lag die zurückgewonnene Menge dieses Stammes etwas höher als der gemessene Wert des reinen Impfstammes, aber noch weit unter dem des virulenten Virus. Nach Sapins Aussage war die Neurovirulenz des LSc 2ab Stammes nach dieser einen Passage durch den Magen-Darm-Trakt für Affen bereits leicht angestiegen, womit die Zunahme der Affinität gegenüber der Zellulose-Säule zu erklären ist.

2.1.4.10. Chromatographisches Verhalten gegenüber Calciumphosphat

Dieser Marker gibt wie die Adsorptionsfähigkeit an Aluminiumhydroxydgel die Affinität eines Virus zu Calciumphosphat an und wird durch die Eluti-

onsrate bestimmt, die abhängt von der Phosphatkonzentration der Pufferlösung, mit der die Elution erfolgt.

O z a k i u.M. (43) untersuchten attenuierte und virulente Poliomyelitisviren aller 3 Typen hinsichtlich ihres chromatographischen Verhaltens. 10 ml einer Calciumphosphatkonzentration aus gleichen Teilen 0,5 m- CaCl_2 und 0,5 m- Na_2HPO_4 wurden in eine Glassäule (10 x 500 mm) gegeben und unter 2 atm Stickstoffdruck gehalten. Das Volumen wurde mit Bromkresol ermittelt. Das gleiche Volumen unverdünntes Virusmaterial wurde zugefügt und später die Elution mit 0,05 - 0,5 m-Phosphatpuffer fortlaufend durchgeführt. Um das Volumen des Eluates zu bestimmen, wurde die Säule mit einer doppelten Menge Phosphatpuffer jeder Molarität gewaschen. Die erste Fraktion und die Elutionsflüssigkeiten wurden titriert.

Die attenuierten und virulenten Stämme zeigten keine Unterschiede in der Adsorptionsrate, wohl aber in der Elutionsrate. Wie aus der Tabelle 11 ersichtlich ist, eluierte der virulente Stamm, Typ 1, bei niedriger Ionenkonzentration und neutralem pH leichter als der attenuierte Stamm.

Fraktionen F	Stamm LSc 2ab, att.		Stamm Mahoney, vir.	
	Titer PBE/ml	Rückgewinnung in %	Titer PBE/ml	Rückgewinnung in %
Virusausgangsmaterial	$4,5 \times 10^7$	-	$1,8 \times 10^8$	-
F 1 (0,05 m)	$1,6 \times 10^3$	0,003	$1,4 \times 10^8$	78,0*
F 4 (0,3 m)	$2,0 \times 10^7$	45,0*	$8,0 \times 10^4$	0,05
F 6 (0,5 m)	$1,3 \times 10^5$	0,2	$2,2 \times 10^4$	0,01

Tabelle 11: Elutionsrate verschiedener Poliomyelitisstämmen von Calciumphosphat (nach O z a k i u.M. (43))

* maximale Wert

Auch in anderen Versuchen eluierte das attenuierte Virus nie unterhalb einer 0,3 m-Salzkonzentration. Keine Unterschiede waren bei den Stämmen der Typen 2 und 3 festzustellen. Die Veränderungen des LSc 2ab Stammes nach Passagen im Impfling äußerten sich ebenfalls in den Elutionsraten, ein Unterschied zum virulenten Stamm blieb aber stets erhalten, so daß sich dieser Marker zur Differenzierung von LSc-Nachkommen und dem Wildstamm anbietet.

2.1.4.11. Verhalten gegenüber Polyanionen (Dextransulfat, DS)
und Polykationen (Diäthylaminoäthylen, DEAE)

A g o l u.M. (1) extrahierten aus dem Agar ein Polysaccharidsulfat, das die Plaquebildung von Virusstämmen (sog. m^-) hemmt und gleichzeitig bei niedrigem Bikarbonatgehalt im Medium zu einer Verzögerung der Plaquebildung bei d-Varianten führt. Dieser Extrakt hemmte die Ausbildung eines CPE bei d^+ -Virusstämmen selbst in flüssigem Medium, vorausgesetzt das Medium enthielt Bikarbonat in niedriger Konzentration. Nach dem Entzug des Polysaccharidsulfates hatte der Agar selbst keinen Einfluß mehr auf die Plaquebildung von d- und d^+ -Varianten in sauren pH-Bereichen. Dieses Polysaccharid wirkte in keiner Weise auf den d^+ -Charakter "wilder" oder revertierter Virusstämme, sowie es auch auf m^+ -Varianten keinen Einfluß hatte (1,2,54,56). Es wäre interessant festzustellen, in wieweit die Virulenz eines Virus abhängt von der Resistenz gegenüber ähnlichen Substanzen im Wirt, wie z.B. Heparin.

In Versuchen stellte sich heraus, daß das Polykation DEAE das DS als Polyanion zu binden und somit zu neutralisieren vermag. Folgende Versuche zeigen das Verhalten einiger Virusstämme gegenüber DS und DEAE.

2.1.4.11.1. m-Marker (Vermehrungsfähigkeit in Gegenwart von Polyanionen im Medium)

Dieser Marker beruht auf der unterschiedlichen Empfindlichkeit von Virusstämmen gegenüber Polyanionen, z.B. DS. Empfindliche Viren (m^-) bilden unter DS-haltigem Agar keine oder nur winzige Plaques aus.

B e n g t s s o n u.M. (9) untersuchten attenuierte und virulente MKS-Virusstämme der Typen A, O und C auf ihre Fähigkeit mit Dextransulfat Plaques zu bilden. Nach einer Adsorption des Virusmaterials (100 - 1 000 KID₅₀/0,2 ml) für 30 Minuten bei 37°C wurden 5 ml Hanks' Lösung und Laktalbumin mit 0,01 % Natriumdextransulfat zugefügt und bei 37°C inkubiert. In Abständen wurden Proben entnommen und titriert.

Dextransulfat hemmte nur die Vermehrung der attenuierten Stämme der Typen C und O₃. Die Stämme des Typs A zeigten kaum einen Unterschied. Der gleiche Test wurde von B e n g t s s o n u.M. (10) mit Poliomyelitisviren, Typ 1, durchgeführt.

Wie aus der Tabelle 12 ersichtlich ist, gibt der m-Charakter nicht immer zuverlässig Auskunft über den Attenuierungsgrad. Im Allgemeinen sind virulente nicht revertierte Stämme m^+ .

Poliomyelitis- Virusstämme Typ 1	m-Marker		d-Marker	
	Titer- differenz	Charakter	Titer- differenz	Charakter
LSc 2ab att.	2,8	-	2,9	-
CHAT SB att.	+0,2	+	0,7	+
Baylor Att.-1	2,9	-	2,4	-
E 206 vir.	+0,1	+	0,0	+

Tabelle 12: Vermehrungsfähigkeit einiger Poliomyelitisstämme unter
0,01 %-igem Agar und bei leicht saurem pH
(nach B e n g t s s o n u.M. (10))

2.1.4.11.2. Verhalten gegenüber Polyionen in einem wässrigen Phasensystem

Das verschiedenartige Verhalten von Virusstämmen gegenüber Polyionen läßt sich mit Hilfe der Technik der Gegenstromverteilung untersuchen und beruht auf der unterschiedlichen Affinität der Viren gegenüber Polyionen in den einzelnen Phasen.

Der Test wurde von B e n g t s s o n u.M. (6,7,10) durchgeführt. Das Phasensystem enthielt: 7 % Natriumdextransulfat 500 und 1,2 % Polyäthylenglykokoll (PEG) in 0,6 m-NaCl-Puffer und 0,01 m- Natriumphosphatpuffer, pH 7,0. Dieses System bildete bei 4°C eine obere und untere Phase von ungefähr gleichem Volumen aus. Die Konzentration der zu suchenden Substanz sollte in beiden Phasen etwa die gleiche sein (d.h. bei einem Trennungskoeffizienten $K=0,1 - 10$). Die Trennung wurde in 20 Röhrchen durchgeführt. 19 Röhrchen enthielten je 20 ml des Systems. Das 20. Röhrchen enthielt das Virus in einer Phasensystemmischung folgender Zusammensetzung: 10,5 g DS 20 %, 3,6 g PEG 10 %, 4,5 g 4 m-NaCl, 0,3 g 1 m-Phosphatpuffer pH 7,0 und 1 g des zu untersuchenden Virusmaterials, Aqua dest. ad 30 g. Nach 30 Minuten Aufbewahrung in einem kalten Raum hatte sich das Phasensystem gebildet, nach Vermischen während weiterer 7 Minuten trennten sich in den anschließenden 30 Minuten die Phasen, wonach die obere jeweils auf das benachbarte Röhrchen übertragen wurde. Dieser Vorgang wurde 19 mal wiederholt. Sobald die Phasen verschwunden waren wurde der Inhalt bei 37°C in einzelne Röhrchen entleert. Wegen seines Einflusses auf m-Virusstämme wurde DS mit Hilfe von 1 ml

1 m-KCl/ml der Fraktion ausgefällt und der Überstand mit der Plaquemethode auf Infektiosität geprüft. Der Koeffizient K wurde nach folgender Formel berechnet:

$$K = \frac{r_{\max} + 0,5}{n + 0,5 - r_{\max}}$$

$r_{\max}$ ist die Anzahl der Röhrchen mit der maximalen Virusmenge
 n ist die Anzahl der Röhrchen (hier: 19)

$$r_{\max} = \frac{0 \cdot a + 1 \cdot b + 2 \cdot c + \dots + n \cdot z}{a + b + c + \dots + z}$$

0 bis n ist die Anzahl der Röhrchen

a bis z ist die Virusmenge/Röhrchen

Es besteht eine klare Beziehung zwischen dem Wert K und dem m-Charakter von Virusstämmen ($K_m = < 0,5$; $K_m = > 2,4$), da beide bedingt sind durch eine Adsorption an DS in der unteren Phase, bzw. im Agar (6,7,10) (siehe dazu Tabelle 13).

Trennungskoeffizient	Virusstämme			
	LSc 2ab att.	CHAT SB att.	Baylor Att-1	E 2o6 vir.
K	0,3	3,9	0,2	4,3
m Charakter	-	+	-	+

Tabelle 13: Trennungskoeffizient K einiger Poliomyelitisstämme, Typ 1 und Vergleich des m-Charakters
(nach Bengtsson u.M. (6))

Diese Methode ermöglicht die quantitative Trennung von Virusstämmen auf Grund ihres unterschiedlichen Verhaltens gegenüber Polyionen.

2.1.4.11.3. Verhalten gegenüber Polyionen in der Ionenaustauschchromatographie

Das Verhalten von Virusstämmen gegenüber Polykationen und -anionen in der Ionenaustauschchromatographie gibt als Marker die unterschiedliche Adsorptionsfähigkeit eines Virus an diese Polyionen - abhängig von verschiedenen pH-Werten oberhalb und unterhalb des Isoelektrischen Punktes - an.

In einem Versuch von Bengtsson u.M. (6,11) wurde als Kationenaustauscher Sephadex-Sulfat (SS) und als Anionenaustauscher DEAE-Sephadex

(DEAE-S) verwendet. Als Puffer zur Rückgewinnung des Virusmaterials dienten Trismaleate, Tris-HCl (Kationenpuffer) oder Phosphat- bzw. Boratpuffer (Anionenpuffer) alle zu 0,05 M in den drei pH-Bereichen von 7,0; 7,5 und 8,0, da der Isoelektrische Punkt (I.P.) zwischen pH 7,4 und 7,6 lag.

Es ergab sich, daß der Stamm LSc 2ab (m) an SS unterhalb des I.P. mit allen Puffern, außer mit Borat- adsorbiert wurde. Am I.P oder darüber war die Adsorption geringer. Eine Adsorption fand an DEAE-S mit Tris-HCl und Phosphatpuffer oberhalb und unterhalb des I.P. und mit Boratpuffer unabhängig vom pH statt. E 206 und die m^+ -Mutante von LSc 2ab wurden nur an DEAE-S mit Boratpuffer bei pH 7,5 und 8,0 adsorbiert.

In der Tabelle 14 wurde versucht, die wichtigsten und in der Praxis am häufigsten verwendeten biologischen und chemisch-physikalischen Marker übersichtlich darzustellen.

Bezeichnung	Biologische Marker
IST	Virulenz "In Vitro"-Adsorption an suspendierte Zellen Immunogenität Intraserotypische Differenzierung Resistenz gegenüber Interferon
rc1	Vermehrungsfähigkeit bei hohen Inkubationstemperaturen Wirtsspektrum auf zellulärer Ebene
	chemisch-physikalische Marker
T	Thermoresistenz gegenüber 56°C Sedimentation im D ₂ O-H ₂ O Dichtegradienten Sedimentation im CsCl Dichtegradienten
pH	Säurestabilität Resistenz gegenüber Formalin
A	Thermoresistenz in Gegenwart von Al ⁺⁺⁺
Aa	Adsorption an Al ⁺⁺⁺
e	Chromatographisches Verhalten gegenüber DEAE-Zellulose-Säule Chromatographisches Verhalten gegenüber Calciumphosphat

Tabelle 14: Übersicht über die wichtigsten, bisher bekannten und in der Praxis gebräuchlichen Marker

2.2. MARKER BEI RHINOPNEUMONITIS

Gegen die Rhinopneumonitis der Pferde wird bisher mit Lebendimpfstoffen geimpft. Da es bei geimpften Stuten zu Aborten kommen kann, bei denen Rhinopneumonitisviren isoliert werden, stellt sich die Frage, in wie weit eine Beziehung besteht zwischen dem Impfvirus und den aus dem Untersuchungsmaterial isolierten Viren.

Rhinopneumonitisstämme sind serologisch einheitlich. Man ist folglich auf andere konstante, reproduzierbare Merkmale angewiesen, mit deren Hilfe sich im Labor Impfstämme von Feldstämmen unterscheiden lassen. Auch hier wären besonders solche Marker von Interesse, die im Zusammenhang mit der Virulenz des Virus stehen, und mit deren Hilfe sich die Stabilität des Impfvirus nach Passagen im natürlichen Wirt kontrollieren ließe.

Als Marker sind bisher bei Rhinopneumonitis-Virusstämmen neben der Trypsin- und Thermoiresistenz hauptsächlich biologische Merkmale verwendet worden.

2.2.1. BIOLOGISCHE MARKER

Die biologischen Merkmale beschränken sich auf das unterschiedliche Verhalten der Virusstämme im Pferd und in Hamstern als Versuchstiere und auf die Vermehrungsfähigkeit einzelner Virusstämme in Zellkulturen.

2.2.1.1. Virulenz für Pferde

Im Experiment und in Feldtesten wurden sowohl der von D o l l u.M. (21, 22) hergestellte, hamsteradaptierte und der von M a y r u.M. (37) auf Schweinenierenzell-Kulturen attenuierte Impfstoff geprüft. D o l l u.M. (21, 22) impften im Experiment und in Feldtesten Pferde unter einem Jahr sowie Stuten (7. - 11. Trächtigkeitsmonat) intranasal mit 3,0 ml des hamsteradaptierten Virus (5a - 100. Kulturpassage), Stamm Ky-D, Titer $10^{6,5}$ - $10^{7,5}$ Hamster LD₅₀/ml. In bestimmten Abständen wurden der Titer der neutralisierenden Antikörper festgestellt und einige Pferde mit dem Ausgangsstamm intranasal reinfiziert.

Auf die Impfung reagierten im Experiment 31 von 53 jungen Tieren mit unterschiedlich hohem Fieber, serösem Nasenausfluß und Leukopenie. Auch bei tragenden Stuten waren ähnliche Reaktionen festzustellen. Vollempfängliche Jungtiere reagierten auf die Impfung in den ersten drei bis vier Wochen mit neutralisierenden Antikörpern bis zu einem Titer von $10^{6,5}$. In dieser Zeit waren die Pferde gegen eine Reinfektion immun. Zwischen der 10. und 14. Woche sank der Titer allmählich. Bei einer Reinfektion kam es zu leichten klinischen Erscheinungen. Von 35 geimpften tragenden Stuten brachten 34 normale Fohlen zur Welt; ein Fohlen wurde 62 Tage post vacc. geboren und starb 30 Stunden später. Von 4298 in einem Feldversuch geimpften tragenden Stuten traten 0,32 % Aborte auf Grund des Impfvirus auf.

M a y r u.M. (37) impften Fohlen, tragende und nicht tragende Stuten mit dem an Schweinnierenkulturen adaptierten RAC-H Stamm, Titer $10^{7,0} - 10^{8,0}$ KID₅₀/ml. Die Pferde wurden entweder intranasal (10 ml) oder intravenös (5,0 ml), bzw. intramuskulär (5,0 ml), intranasal (5,0 ml) oder nur intramuskulär (5,0 ml) geimpft. In Abständen wurden ~~Seren~~ auf neutralisierende Antikörper untersucht und außerdem Harn und Blut einiger Tiere, sowie die Organe zweier nach einer Impfung normal geborener Fohlen auf ihren Virusgehalt geprüft.

Der Impfstamm hatte bereits nach 105 - 185 ENS-Passagen seine Virulenz, nicht aber seine immunisierenden Eigenschaften, weitgehend verloren. Außer leichtem biphasischem Fieber 1 - 9 Tage post vacc. konnten bei den vaccinierten Pferden keine klinischen Anzeichen einer Infektion nachgewiesen werden. Alle Tiere entwickelten neutralisierende Antikörper. Eine Reisolierung des Erregers aus Blut, Harn, Nachgeburtsteilen oder Organen der untersuchten Fohlen gelang nicht.

2.2.1.2. Virulenz für Hamster

Hamster unterliegen im Allgemeinen einer Infektion mit Rhinopneumonitisserregern. Laufende Passagen des RAC-H Stammes in Schweinnierenzellkulturen führen dagegen zu einer allmählichen Abnahme der Hamster-virulenz.

M a y r u.M. (37) titrierten den in Schweinnieren gezüchteten RAC-H

Stamm in Goldhamstern durch intraperitoneale Injektion. In den ersten 20 ENS-Passagen erreichte das Virus einen Titer um $10^{3,2}$ LD₅₀. In der 25. Kulturpassage fiel der Titer auf $10^{2,0}$, in der 64. Passage auf $10^{0,9}$ LD₅₀.

Nach einer intraperitonealen Injektion mit dem hochpassierten Impfstamm RAC-H überlebten die meisten Hamster und waren gegen eine Reinfektion mit 10 000 infektiösen Dosen des vollvirulenten Materials immun (46).

2.2.1.3. Wirtsspektrum auf zellulärer Ebene

Das Rhinopneumonitisvirus besitzt ein sehr breites Kulturspektrum (32). In verschiedenen Zellsystemen verhalten sich einzelne Virusstämme nicht immer gleich. Unterschiede drücken sich im Titer, in der Art des zytopathogenen Effektes und im Plaquibildungsvermögen aus. So eignen sich Zellstämme wie beispielsweise BHK, FL und der Lungen 106-Zellstamm nicht für die Züchtung des RAC-H Stammes, wohl aber für Ky-D und bedingt für H1835. Als Marker kommen diese Zellsysteme nicht in Frage, da die Ergebnisse nicht genügend signifikant und konstant sind.

Dagegen berichtet B o r g e n (12), daß die Vermehrungsfähigkeit bestimmter Virusstämme in L-Zellen (Mäusefibroblasten-Zellstamm) als sog. L-Marker für diese Stämme verwendet werden kann. Hierfür wurden vom Autor im Plaquetest die Vermehrungsfähigkeit der ersten Passage des Impfstammes "Prevaccinol" und seines Ausgangsstammes RAC-H, sowie KY-D und verschiedene Isolate aus abortierten Fohlen über 4 - 5 Tage beobachtet.

Alle Stämme, außer RAC-H der 20. Kulturpassage und dem Impfstamm "Prevaccinol" bildeten Plaques aus (L⁺). Der L-Charakter ist offensichtlich nicht an den Attenuierungsgrad gebunden. Inzwischen ist der L⁺-Charakter auch beim Stamm Army 183 gefunden worden (12).

M a y r u. M. (36) verglichen die Vermehrungsfähigkeit verschiedener Kulturpassagen in Schweinenierenzellkulturen der Stämme RAC-H und KY-D hinsichtlich Latenzzeit und Titer. Der RAC-H Stamm der 1. Kulturpassage zeigte bereits innerhalb der ersten 12 Stunden p.i. einen Titeranstieg; dagegen vermehrte sich der Stamm RAC-H der 36. Passage in den ersten 24 Stunden am langsamsten, erreichte aber nach 72 Stunden p.i. den höchsten Titer. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in der Tabelle 15 zusammengefaßt.

Virusstamm	ENS-KP	Titer KID ₅₀ /ml nach einer Inkubationszeit von			
		12 Std.	24 Std.	48 Std.	72 Std.
RAC-H	1.	1,0	3,25	3,75	4,25
RAC-H	36.	0,5	1,5	5,0	6,0
Ky-D	15.	0,5	3,0	4,25	4,75

Tabelle 15: Ergebnisse der Vermehrungskurven dreier Rhinopneumonitisstämme in Schweinenierenzellkulturen
(nach M a y r u. M. (36))

2.2.2. CHEMISCH-PHYSIKALISCHE MARKER

B a r t h a (3, 4,) erwähnt, daß einige Rhinopneumonitisstämme relativ stabil gegenüber 50° C und der Behandlung mit Trypsin sind. Diese Stämme zeigten gleichzeitig eine verminderte Hamstervirulenz.

3. E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

3.1. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

3.1.1. V I R U S S T Ä M M E

Für den Vergleich von Rhinopneumonitis-Virusstämmen dienten die auf verschiedene Weise adaptierten RAC-H Stämme (36,37) und zahlreiche in der Praxis isolierte Feldstämmen. Zu den Feldstämmen zählen H 1833, H 2684, H 3748, PC 288, PC 498, PC 499, PC 292, PC 712, PC 410, PC 651, C 6505⁺; P 1 (V 527)⁺⁺, D 18, D 102 und NHV (Nikohodenvirus). Mit Ausnahme von P 1 (V 527) und NHV stellen alle Stämme Abortisolationen dar. P 1 wurde aus einer Nasentupferprobe eines Pferdes mit rhinitischen Erscheinungen isoliert. Das NHV stammt aus der 2. Subpassage einer Pferdehodenkultur.

Die Stämme H 1833, H 2684, H 3748, PC 288, PC 498, PC 499, sowie D 18 und D 102 standen zu Beginn der Versuche noch nicht zur Verfügung, so daß die Beobachtungen hierüber noch nicht abgeschlossen sind.

Die jeweils getesteten Virusstämmen und entsprechenden Kulturpassagezahlen sind den Tabellen zu den Versuchen zu entnehmen.

Das Virusmaterial wurde vor den Versuchen nochmals im Neutralisationstest geprüft. Ebenso erfolgte vor jeder Passage und vor den Versuchen eine Überprüfung des entsprechenden Virusstammes auf bakterielle Kontamination. Bei Verdacht auf das Vorhandensein von Fremdviren wurden die Präparate von beimpften und unbeimpften Kulturen angefertigt, und im positiven Fall wurde das Material verworfen.

3.1.2. Z E L L K U L T U R E N

Für die Anzüchtung der einzelnen Virusstämmen und für die verschiedenen Versuche dienten Schweinenierenzellen (ENS) als Primärkulturen und Pferdeeithelzellen (E. Derm., NBL-6) als Zellstamm.

Für den Vergleich des Gewebekulturspektrums wurden kurzzeitig Primärkulturen aus Hammelnieren (ENH), Kälbernieren (ENK) und Kälberhoden (KH) und als Zellstämmen Babyhamsternieren (BHK) und Kaninchennieren (KN) gezüchtet.

⁺) Für die Überlassung der Stämme danken wir Prof. Dr. K. Petzold, Hannover

⁺⁺) Ebenso danken wir Dr. Teufel, Berlin, für die Zusendung dieses Stammes

Die Primärkulturen wurden nach dem üblichen Verfahren der Trypsinandaueung (23,63) aus frischen Organen hergestellt. Die Anzuchtzahl betrug 500 000 - 1 Mill. Zellen/ml Anzuchtmedium. Als Anzucht- und Erhaltungsmedium diente für ENS Earle'sche Lösung in der üblichen Zusammensetzung. Da Titrationen mit dem sog. Leibowitzmedium in ENS ein um $1 - 2 \log_{10}$ höheres Ergebnis brachten, wurden die Tenazitätsversuche und die höheren Passagen in diesem Medium durchgeführt und titriert. Für die ENH, ENK und KH-Kulturen diente als Medium ausschließlich die Earle'sche Lösung.

Die Vermehrung der Zellstämme erfolgte mittels Abtrypsinierung und Neuaussaat -bei NBL und KN im Verhältnis 1:2, bei BHK 1:5- .

Das Anzuchtmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und sobald die Kultur dicht war, durch Erhaltungsmedium ersetzt.

3.1.3. VIRUSPASSAGEN UND TITRATIONEN

Die Anreicherung der Rhinopneumonitisviren geschah einheitlich in ENS-Kulturen. Die Virusernte erfolgte durch 2-3-maliges Einfrieren und Auftauen der Kultur und anschließendes Abzentrifugieren der Zellbestandteile.

Sobald ein für die Versuche brauchbarer Titer erreicht war, wurde das Virus nach der Adsorptionsmethode auf Rouxschalen verimpft und die Virusernte in Mengen von 2-4 ml abgefüllt und bei -65°C gelagert. Das so gewonnene Virus diente als Ausgangsmaterial für die nachfolgenden Versuche. Die Titer dieses Ausgangsmaterials wurden kurz nach der Einlagerung und in Abständen über die ganze Dauer der Lagerung gemessen.

Die Berechnung des Infektiositätstiters erfolgte nach der Methode von Behrens (5) und Kärber (30). Beimpft wurden jeweils 4 Röhrchen. Der Infektiositätstiter ist als KID_{50} angegeben und bezieht sich auf 0,1 ml. Waren bei dem unverdünnten Material zwei von vier Röhrchen positiv, so ist dies in den Ergebnissen mit 0,0 angegeben. Keine nachweisbare Infektiosität wurde mit 0 bezeichnet.

Die Titration der einzelnen Viruspassagen erfolgte stets in demjenigen Zellsystem, in dem die Anzüchtung erfolgte. Als Verdünnungsflüssigkeit diente das Erhaltungsmedium der betreffenden Kultur.

Einmal für Titrationen oder Versuche aufgetautes Material fand keine weitere Verwendung.

3.1.4. ANFERTIGUNG VON ZELLKULTURPRÄPARATEN

Nach der Zelloidinmethode hergestellte Zellkulturpräparate dienten zum Nachweis von Kerneinschlüssen. Hierfür wurden die beimpften Kulturen nach Abgießen des Mediums mit Bouin'scher Lösung fixiert (30 Min.), nach dreimaligem Waschen mit Aceton mit Zelloidin beschickt und verschlossen 30 Min. gehalten. Anschließend wurde das überflüssige Zelloidin abgegossen, der trockene Zelloidinfilm über der Kultur von der Glaswand gelöst, mit der Unterseite auf einen befeuchteten Objektträger ausgebreitet und mit Nelkenöl bedeckt. Nach einer Einwirkungszeit von 10 Min. wurde erst das Nelkenöl mit Alkohol (96 %-ig) und dann das Zelloidin mit Äther-Alkohol (1:1) ausgewaschen.

Die Färbung erfolgte mit Hämatoxilin-Eosin.

3.1.5. MARKERTESTS

3.1.5.1. Versuche mit biologischen Markern

3.1.5.1.1. Verhalten in Zellkulturen

Im Verlaufe von Passagen erfolgte eine Überprüfung der Vermehrungsfähigkeit der genannten Virusstämme in den verschiedenen Zellsystemen. Dabei wurden die einzelnen Stämme und Kulturpassagen hinsichtlich des zeitlichen Auftretens und Ausmaßes des zytopathischen Effektes, der Bildung von Kerneinschlüssen (Typ A Cowdry) und des Titers verglichen.

Beim zytopathischen Effekt unterschied man zwischen Lysis, Abkuglungen und Riesenzellbildung, bzw. einer Art Ballonisierung der Zelle, die durch eine stärkere Lichtbrechung im Mikroskop auffiel. Eine Beobachtung und Protokollierung des Effektes beimpfter Röhrchen erfolgte jeden Tag.

Zum Nachweis von Kerneinschlußkörperchen wurden zum größten Teil am Tage des ersten deutlich sichtbaren Effektes Kulturpräparate hergestellt. Von beimpften ENH-Kulturen wurden in den ersten vier Tagen p.i., von NBL-Kulturen über einen Zeitraum von 10 Tagen täglich Präparate angefertigt. Gleichzeitig erfolgte die Herstellung von Kontrollpräparaten unbeimpfter Kulturen.

Von vier Feldstämmen (PC 410, PC 712, C 6505 und P 1 (V 527) wurde die Vermehrungsrate in Schweinenierenzellen verglichen. Für diesen Versuch fanden Vierkantflaschen Verwendung. Nach einer 3-stündigen Adsorptionsphase bei Raumtemperatur wurde die Kultur mit PBS gewaschen, mit Leibo-

witzmedium beschickt und weiter bei 37°C inkubiert. Am 1., 2., 3. und 6. Tag p.i. entnahm man je eine Vierkantflasche, erntete das Virusmaterial und titrierte im gleichen Zellsystem.

3.1.5.1.2. Adsorptionsversuche an Pferdelymphozyten

Mehrere Darmbeinlymphknoten eines frisch getöteten Fohlens wurden mechanisch zerkleinert und 4 Stunden trypsiniert (PBS-T, 0,25 %-ig). Anschließend wurden die Zellen filtriert, dreimal mit physiologischer Lösung gewaschen, zentrifugiert und in PBS (pH 7,3) suspendiert.

Die Adsorption erfolgte mit Rhinopneumonitisstämmen der 1. NBL-Passage; die anschließende Titration wurde im gleichen Zellsystem durchgeführt.

Zur Adsorption wurden je 10 ml Zellsuspension (10^6 Zellen/ml) und unverdünntes Virusmaterial vermischt, bei 37°C für eine halbe Stunde geschüttelt und anschließend über Nacht bei 4°C gehalten.

Der Adsorptionsnachweis erfolgte durch Titration sowohl des Überstandes nach Zentrifugation bei 3 000 U/min. für eine halbe Stunde, als auch des Sedimentes, das mit PBS auf das alte Volumen (10 ml) aufgefüllt und durch mehrmaliges Einfrieren und mit Hilfe des Ultraturax aufgeschlüsselt wurde. Kontrollen liefen allen Versuchsgängen parallel.

3.1.5.1.3. Adsorption an Pferdeleukozyten

Die Leukozyten für den Adsorptionsversuch stammten aus dem peripheren Blut Rhinopneumonitis-antikörperfreier Pferde. Das Blut wurde hierfür mit kristallinem Kalium-Ammoniumoxalat (2:3) stabilisiert und in leichter Schrägstellung bei Raumtemperatur ca. eine halbe Stunde aufbewahrt bis die Erythrozyten sedimentiert waren. Anschließend gewann man den Überstand und zentrifugierte diesen bei 3 000 U/min. während 10 Minuten. Das Sediment stellte man mit Plasma auf 50×10^6 Zellen/ml ein und untersuchte es mikroskopisch.

Die Adsorption wurde mit zwei Versuchsanordnungen durchgeführt. Die erste Versuchsanordnung entspricht der unter 3.1.5.1.2. genannten. Die zweite beschränkte sich auf die Beobachtung der Adsorption über einen Zeitraum von drei Stunden bei 37°C. Hierfür wurden Zellsuspension und unverdünntes Virusmaterial (1 ml $\bar{a}\bar{a}$) gemischt und unter zeitweiligem leichtem Schwenken im Wasserbad von 37°C gehalten. In bestimmten Abständen wurden Proben entnommen, bei 3 - 4 000 U/min. 10 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand auf nicht adsorbiertes Virus untersucht. Viruskontrollen, 1:1 mit Leibowitzmedium verdünnt, liefen parallel.

3.1.5.2. Versuche mit chemisch-physikalischen Markern

Angeregt durch die Ergebnisse der Tenazitätsversuche von B a r t h a u. M. (4) mit Aqua dest., 2 m-MgCl₂ und 0,25 %-igem Trypsin bei einigen Vertretern der Herpesgruppe, wurden die gleichen Versuche mit verschiedenen Rhinopneumonitisstämmen (Tabellen 19 - 25) durchgeführt. Das Hauptinteresse galt dabei dem RAC-H Stamm der niedrigen und hohen ENS-Passage. Daher wurde jeder Versuch mit einem Stamm der 8. oder 10. und der 256. bis 270. ENS-Kulturpassage durchgeführt, z.T. auch zusätzlich mit einem RAC-H Stamm der 419. ENS KP, um jede nur mögliche Veränderung des Stammes während weiterer Passagen in Schweinenierenkulturen erfassen zu können. Parallel liefen Tests derjenigen Feldstämme, die auf Grund der Vorgeschichte im Vergleich zum RAC-H Stamm der hohen ENS-Passage interessant erschienen, und die sich genügend anreichern ließen, ohne einen zu hohen Grad der Attenuierung erreicht zu haben. Die verwendeten Stämme sind den jeweiligen Tabellen zu den Ergebnissen zu entnehmen. Für die Versuche mit Aqua dest. und MgCl₂ fanden ENS- und NBL-Viruspassagen, für die Trypsinresistenzversuche nur ENS-Passagen Verwendung. Zusätzlich führte man einen Thermoresistenzversuch in physiologischer Kochsalzlösung (PBS) und einen Säuretest bei pH 3,0 und 5,6 durch. Als Kontrollen dienten Gemische aus gleichen Teilen Virusmaterial und PBS, die sofort nach dem Auftauen des Virusmaterials titriert wurden.

3.1.5.2.1. Thermoresistenz in Aqua dest. bei 50°C

Zur Thermoresistenzprüfung wurde je 1 ml Virusmaterial und steriles Aqua dest. gemischt und für 60 Min. in ein Wasserbad von 50°C gestellt. Gleich darauf folgte die Titration der Proben in der jeweiligen Kultur.

3.1.5.2.2. Thermoresistenz in 2 m-MgCl₂-Lösung bei 50°C

Um die Einwirkung von bivalenten Kationen bei einer Hitzeinaktivierung zu testen, wurden je 1 ml Virusmaterial und sterile 2 m-MgCl₂-Lösung gemischt, 30 Min. im Wasserbad bei 50°C inkubiert und danach sofort in der betreffenden Kultur titriert.

3.1.5.2.3. Thermoresistenz in PBS bei 50°C

Zum Vergleich der Hitzeinaktivierung mit und ohne bivalente Kationen verwendete man den gleichen Versuch mit PBS bei 50°C für 30 Min. mit NBL-Viruspassagen.

3.1.5.2.4. Trypsinresistenz

Zur Prüfung der Resistenz einiger Rhinopneumonitistämme der ENS-Passagen gegenüber 0,25 %-igem Trypsin wurde je 1 ml Antigen und sterile Trypsinlösung (PBS-T) gemischt und für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurden einige Röhrchen mit 0,1 ml der auf die Hälfte verdünnten Trypsinlösung beimpft, um die Wirkung von Trypsin auf die Gewebekultur kontrollieren zu können.

3.1.5.2.5. Säuretest bei pH 3,0 und 5,6

Die Einstellung des pH-Wertes für diesen Versuch erfolgte nach Mo. Ilvaine, beschrieben von K o d a t z k i (33), mit 0,1 m-Zitronensäure ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) und 0,2 m-Natriumbikarbonat (Na_2HPO_4) in folgender Zusammensetzung:

pH 3,0 : 4,11 ml Na_2HPO_4 + 15,89 ml $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$

pH 5,6 : 11,6 ml Na_2HPO_4 + 8,4 ml $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$

Für den Versuch wurde 1 ml des Virusmaterials vermischt mit 1 ml einer der beiden Lösungen und drei Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen und anschließend titriert. Außerdem beimpfte man Kulturen mit 0,1 ml einer der beiden Lösungen ohne Antigen, um den Einfluß des Puffergemisches auf die Kultur zu überprüfen.

3.2. ERGEBNISSE

3.2.1. BIOLOGISCHE MARKER

3.2.1.1. Verhalten in verschiedenen Zellkulturen

Die genannten Rhinopneumonitis-Virusstämme vermehrten sich in geeigneten Zellkulturen (Tab. 16) unter Ausbildung eines typischen zytopathischen Effektes. Dieser zeichnete sich aus durch Abkugelungen und riesenzell-ähnliche Zellformationen mit syncytienartigem Charakter. An diese gegnerativen Veränderungen schloß sich eine m.o.w. ausgeprägte Lysis an.

Hinsichtlich Vermehrungsfähigkeit, zeitliches Auftreten und Ausmaß des CPE konnten bei den einzelnen Virusstämmen in den geprüften Kulturen Unterschiede beobachtet werden, die eine Unterteilung der Stämme in drei Gruppen zuließen (Tab. 16). Die RAC-H Stämme der niedrigen und hohen ENS-Passage vermehrten sich im Vergleich zu den Feldstämmen in den angeführten Gewebekulturen am besten, was sich in der besseren Adaptierungsfähigkeit, der kürzeren Inkubationszeit und dem Erreichen eines höheren Titers in den betreffenden Kulturen ausdrückte (s. auch Tab. 17). Beide RAC-H Stämme ließen sich von ENS ohne Schwierigkeiten an eines der genannten heterogenen Zellsysteme adaptieren. Ein CPE mit der Ausbildung von typischen Abkugelungen und Riesenzellen trat in den ersten Kulturpassagen bereits am 3. bis 4. Tag p.i. plötzlich auf; nach der 5. Passage in der gleichen Kultur war ein 100 %-iger CPE meist schon nach 72 Stunden p.i. zu beobachten. Der Titer stieg in den ersten 3 Passagen an und hatte nach der 5. Passage seinen maximalen Wert erreicht, der über weitere Passagen relativ konstant beibehalten wurde. Der Titer des RAC-H Stammes der hohen ENS-KP betrug in KN $10^{5,25}$ KID₅₀ und in ENH $10^{6,5}$ KID₅₀; der des RAC-H Stammes der niedrigen ENS-KP lag um 1,0 bis 1,5 log₁₀ niedriger.

In ENS zerstörten beide RAC-H Stämme innerhalb von 2 Tagen p.i. die Kultur zu 100 % und erreichten durchschnittlich einen Titer von $10^{6,25}$ KID₅₀.

Die in Tabelle 16 unter II genannten Feldstämme ließen sich in ENS und ENH relativ gut vermehren. In diesen Kulturen trat in den ersten Passagen die Ausbildung von Abkugelungen und Riesenzellen gegenüber der Lysis stark zurück. Erst nach der 3. KP konnten mit steigendem Titer auch deutlich blasige Zellen in der Kultur beobachtet werden; eine 100 %-ige Zerstörung trat hier frühestens nach dem 3. Tag p.i. auf. Der Titer dieser Feldstämme überstieg in ENS und ENH nie den Wert von $10^{4,5}$ KID₅₀.

Die untersuchten Stämme PC 410, PC 712 und C 6505 ließen sich im Gegensatz zu den parallel dazu getesteten RAC-H Stämmen nicht so gut an KN und KH adaptieren. Obwohl in diesen Kulturen in den ersten 5 Passagen noch ein deutlicher Effekt sichtbar war, und in KN in der 3. KP Titer von $10^{4,0}$ - $10^{4,5}$ KID gemessen wurden, wurde bei weiteren Passagen nie mehr als 50 % der Kultur zerstört.

Guppierung	Virusstämme und Ausgangspassagen	Zellkulturen						
		ENS	ENH	KH	ENK	BHK	KN	NBL
I.	RAC-H 256. ENS	+++	+++	++	++	++	+++	+++
	RAC-H 8. ENS	+++	+++	++	++	++	-	+++
II.	PC 410 4. ENH	++	++	+	+	+	+	++
	PC 712 3. ENH	++	++	+	+	+	+	++
	C 6505 3. ENH	++	++	+	+	+	+	++
	P 1 (v 527) 6. ENS	++	+	-	-	++	-	++
	D 18 1. ENS	++	-	-	-	+	-	++
	D 102 1. ENS	++	-	-	-	+	-	++
	PC 288 2. ENH	++	++	-	-	++	-	++
	PC 498 2. ENH	+	++	-	-	++	-	++
	PC 499 2. ENH	++	++	-	-	++	-	++
	H 1833 8. PN	++	++	-	-	++	-	++
	H 2684 4. PN	++	++	-	-	++	-	++
	H 3748 4. PN	++	++	-	-	++	-	++
III.	PC 651 4. ENH	±	++	+	+	-	++	-
	PC 292 10. KH	±	++*	+	-	-	++*	-
	NHV 10. KH	o	++*	++	+	+	+	±

Tabelle 16: Wirtsspektrum der untersuchten Rhinopneumonitsstämme auf zellulärer Ebene

* Züchtung erst nach hohen KH-Passagen möglich

- nicht getestet

o kein Effekt

± nicht konstant, trotz anfänglicher guter Vermehrung bald nicht mehr nachweisbar

+ kein vollständiger CPE während des untersuchten Zeitraums nachweisbar

++ 100 %-iger CPE innerhalb der ersten 10 KP am 3.-7. Tag p.i.

+++ 100 %-iger CPE nach den ersten 2-3 KP innerhalb von 3 Tagen p.i.

Die unter Gruppe III in der Tabelle 16 aufgeführten Virusstämme verhielten sich in den Gewebekulturen anders als die bisher genannten Feldstämme. Der Stamm PC 651 vermehrte sich gut in ENH und erreichte nach der 8. Passage einen Titer von $10^{3,5}$ KID₅₀ mit deutlichem CPE; der Stamm PC 292 vermehrte sich am besten in KH Kulturen, deren Zellen er aber nie zu 100 % zerstörte. Beide Stämme ließen sich nicht an ENS adaptieren. In dieser Kultur konnte beim Stamm PC 651 nur bis zur 7. KP und beim Stamm PC 292 bis zur 4. KP ein deutlicher Effekt nachgewiesen werden. Eine Züchtung über weitere Passagen war an Hand eines zytopathischen Effektes nicht nachweisbar. Große Schwierigkeiten in der Züchtung bereitete auch der NHV Stamm. Nach seiner Isolierung ließ er sich in Pferdehoden und in Kälberhoden anzüchten. In KH wurde ein 100 %-iger CPE aber nie früher als eine Woche p.i. beobachtet. In dieser Kultur wurden Titer von $10^{3,0}$ - $10^{3,5}$ KID₅₀ nach der 15. Passage gemessen. Die Adaptierung der beiden Stämme PC 292 und NHV an andere Kulturen wie ENH und KN gelang nur nach mehr als 10 Passagen in KH, was auf einen gewissen Attenuierungsgrad schließen läßt, der für die Versuche unerwünscht war. Bei NHV war eine Virusvermehrung in ENK, ENH und KN oft nur an Hand von Kerneinschlußkörperchen nachzuweisen; der CPE war oft undeutlich oder gar nicht erkennbar.

Virusstamm und Ausgangspassage	Zahl der laufenden Passagen	erreichte Titer	100% CPE am Tag p.i.	Zahl der laufenden Passagen	erreichte Titer	100% CPE am Tag p.i.
	in ENS			in ENH		
RAC-H 256. ENS	264	$10^{6,25}$	2.	7	$10^{6,5}$	2.
RAC-H HamsterKP	8	$10^{6,0}$	2.	7	$10^{6,0}$	2.
PC 410 4. ENH	9	$10^{4,5}$	4.	8	$10^{3,25}$	5.
PC 712 3. ENH	8	$10^{4,0}$	4.	7	$10^{3,5}$	5.
C 6505 3. ENH	9	$10^{4,5}$	4.	7	$10^{4,0}$	5.
PC 651 4. ENH	9	o	kein CPE	8	$10^{3,5}$	5.
PC 292 10. KH	8	o	kein CPE	8	$10^{3,25}$	4.
NHV 16. KH	8	o	kein CPE	7	$10^{2,5}$	6.

Tabelle 17: Vergleich der Titer und des Zeitpunkts eines 100 %-igen CPE einiger Rhinopneumonitisstämme in ENS und ENH

In Tabelle 17 sind vergleichsweise die Titer und der Zeitpunkt einer vollständigen Zerstörung der Kultur für einige Stämme in ENS und ENH angegeben. Um eine Aussage über die Züchtungsfähigkeit eines Virus in einem neuen Zellsystem machen zu können, müssen wenigstens 6 - 8 Passagen in der Kultur durchgeführt werden.

Die Ergebnisse in Tabelle 17 bestätigen die gute Vermehrungsfähigkeit der RAC-H Stämme in beiden geprüften Zellarten. Die Stämme PC 410, PC 712 und C 6505 erreichten in ENS etwas höhere Titer als in ENH, wo die Anzuchtung erfolgte. Bei der Vermehrungsfähigkeit von PC 292 und NHV in ENH ist zu beachten, daß erst mehrere Passagen in KH nötig waren, ehe die Adaptation gelang.

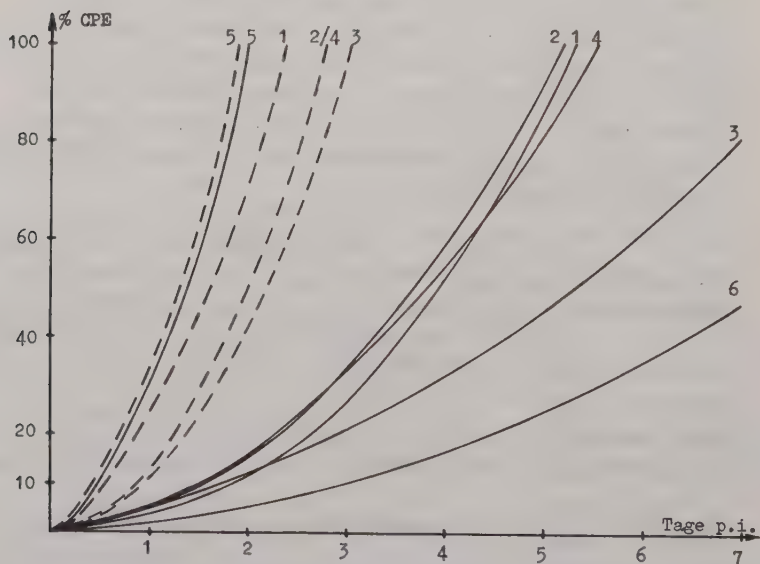


Abbildung I : Vermehrungskurven einiger Rhinopneumonitisstämme in ENS

	1. ENS	6. ENS
C 6505	1 ———	1 ———
PC 651	2 ———	2 ———
PC 712	3 ———	3 ———
PC 410	4 ———	4 ———
RAC-H	5 ———	5 ———
PC 292	6 ———	

Der graphische Vergleich des zeitlichen Auftretens eines zytopathischen Effektes bei den einzelnen Stämmen in den ersten Kulturpassagen auf ENS (Abb. I) zeigt bei dem Stamm RAC-H die steilste Vermehrungskurve, d.h. dieser Stamm zerstörte infolge seiner raschen Vermehrungsfähigkeit den Zellrasen in der kürzesten Zeit p.i..

Bei den genannten PC Stämmen und C 6505 verlaufen die Kurven der ersten Passagen flach und werden mit steigender Passagezahl unterschiedlich steiler. Die beste Vermehrung in fortlaufenden Passagen zeigte zuerst der Stamm PC 651, der sich aber ab der 7. KP nicht mehr weiter züchten ließ. Die Kurve des PC 292, der nur bis zur 4. KP züchtbar war, verlief von Anfang an am flachsten. PC 410, der in der ersten Passage eine scheinbar raschere Vermehrung zeigte, zerstörte in der 6. Passage die Gewebekultur in der gleichen Zeit wie die Stämme PC 712 und C 6505. Der Titer dieser drei Stämme blieb ab dieser Passage ja auch annähernd gleich hoch.

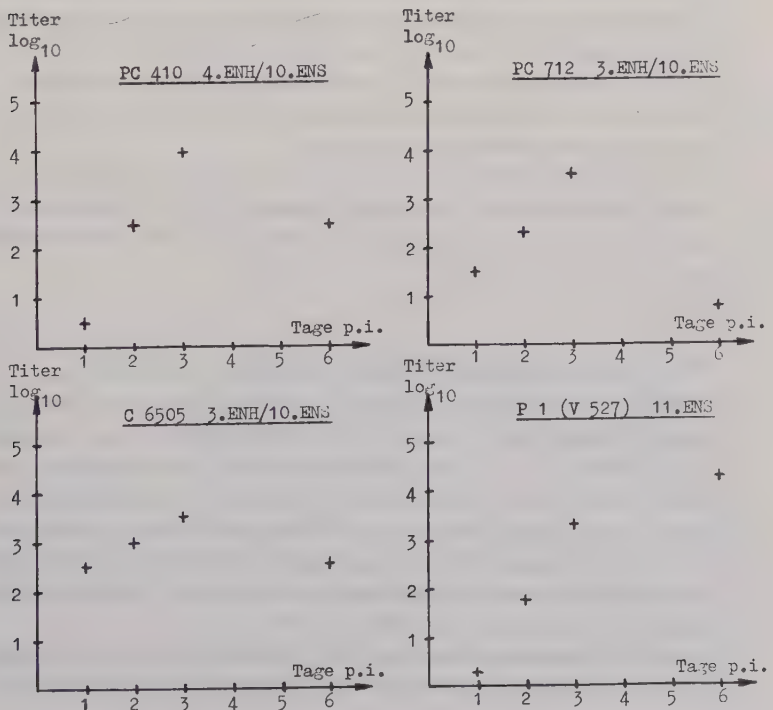


Abbildung II : Darstellung der Vermehrungsfähigkeit von 4 Feldstämmen in ENS während 6 Tagen p.i.

Die Vermehrungskurven in Abbildung II zeigen an Hand der gemessenen Infektiositätstiter die Vermehrungsrate von vier Feldstämmen in ENS. PC 410, PC 712 und C 6505 hatten ihren maximalen Titer am 3. Tag p.i. erreicht; die Kultur war zu diesem Zeitpunkt zu 70 - 90 % zerstört. Der Virustiter fiel darauf rasch ab und erreichte bei PC 712 am 6. Tag p.i. den tiefsten Wert mit $10^{0,5}$ KID₅₀. Der Stamm P 1 (V 527) hatte am 3. Tag p.i. einen Titer von $10^{3,25}$ KID₅₀ bei einem 20 %-igen CPE. Sein maximaler Titer wurde am 6. Tag p.i. gemessen.

Die Bildung von intranukleären Einschußkörperchen vom Typ A (Cowdry) stellt ein einheitliches Charakteristikum für die Vermehrung von Rhinopneumonitisviren dar (32). In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine qualitative Beziehung zwischen dem CPE und der Bildung von Kerneinschlüssen beobachtet werden. Bei deutlich ausgeprägtem zytopathischem Effekt in einer Kultur waren die meisten Einschlüsse festzustellen.

Die meisten Einschlüsse waren bei beiden RAC-H Stämmen in ENS und ENH nachweisbar. Die Stämme PC 651 und PC 292 bildeten hier dagegen nur vereinzelt Kerneinschlüsse. Eine Ausnahme machte der NHV Stamm, der trotz eines kaum sichtbaren CPE in ENH auffallend deutliche und zahlreiche Kerneinschlüsse bildete, ebenso in PH, KH und ENK. In ENS ließen sich dagegen nie Einschlüsse nachweisen.

Die Untersuchung auf Kerneinschlüsse in NBL-Kulturen fiel negativ aus. Dieser Zellstamm scheint den Ergebnissen mit den ersten Viruspassagen in diesem Zellsystem zufolge nicht für den Nachweis von Einschlüssen geeignet zu sein.

3.2.1.2. Adsorption an Lymphzellen und Leukozyten des Pferdes

Die Methode der Adsorption an Lymphzellen und Leukozyten nach der ersten Versuchsanordnung stellte sich als unbrauchbar heraus, da sie -gemessen an den Kontrollen - zu einem starken Titerabfall aller getesteten Virusstämme, speziell bei den Feldstämmen, führte. Ein geringer infektiöser Anteil, der im Sediment bei fast allen Stämmen nachgewiesen werden konnte, ließ lediglich vermuten, daß das Virus adsorbiert wurde. Eine Unterscheidung zwischen den RAC-H Stämmen der niedrigen und hohen ENS-Passage und den Feldstämmen ließ diese Methode nicht zu.

Die zweite Versuchsanordnung, bei der die Adsorptionsrate über drei Stunden bei 37°C untersucht wurde, erbrachte bessere Ergebnisse. Die Titer

der Kontrollen blieben in diesem Versuch bei 37°C über den gesamten Zeitraum bei allen getesteten Stämmen relativ konstant. Eine Ausnahme machte der Stamm P 1 (V 527), der schon in der ersten Stunde bei 37°C seine Infektiosität fast vollständig verlor und daher nicht weiter ausgewertet werden konnte.

Der Versuch geht von der Annahme aus, daß bei Adsorption eines Virus der Titer im Überstand sinkt und es sich bei den im Überstand nachweisbaren infektiösen Partikeln um nicht adsorbiertes oder inaktiviertes Virus handelt (16).

Wie aus Tabelle 18 ersichtlich ist, blieb beim RAC-H Stamm der hohen ENS-Passage der Titer im Überstand und den Kontrollen über den Zeitraum von 3 Stunden gleich hoch und nahezu konstant. Der RAC-H Stamm der 8. ENS KP zeigte sich in den ersten zwei Stunden der Inkubation unverändert. In der 3. Stunde sank der Titer des Überstandes gegenüber der Kontrolle plötzlich ab und betrug nur noch $10^{1,0}$ KID₅₀. Von den Feldstämmen zeigte der Stamm H 3748 im Überstand bereits in der 1. Stunde einen leichten Titerabfall gegenüber den Kontrollen; alle anderen getesteten Stämme wiesen erst ab der 2. Stunde einen Titerunterschied von 1,0 - 2,0 log₁₀ auf. Die Virusstämme C 6505 und H 3748 waren in der 3. Stunde vollständig aus dem Überstand verschwunden. Mit Ausnahme des RAC-H Stammes der 256. ENS-

Virusstämme	Titer, KID ₅₀ nach einer Inkubationszeit von...						
	0	1 Std.		2 Std.		3 Std.	
		Über- stand	Kon- trolle	Über- stand	Kon- trolle	Über- stand	Kon- trolle
RAC-H 264.ENS	5,5	4,5	4,25	4,0	4,5	3,75	4,0
RAC-H 8.ENS	5,5	5,25	6,0	6,0	6,0	1,0	5,5
C 6505 3. ENH/11.ENS	3,75	3,25	3,5	1,5	3,25	0	3,5
D 18 3.ENS	3,0	3,0	2,75	1,5	3,0	1,25	3,0
H 3748 4. PN/2.ENS	3,25	1,75	2,75	1,75	2,5	0	2,5
PC 288 2. ENH/2.ENS	3,0	-	-	0,25	2,25	0,5	2,0
P 1 (V 527) 12.ENS	2,0	0	0,0	0,0	0,5	-	-

Tabelle 18: Ergebnisse der Adsorption an Leukozyten vom Pferd

Passage konnte nach 2-3 Stunden eine Adsorption an weiße Blutkörperchen aus dem strömenden Blut des Pferdes festgestellt werden.

3.2.2. CHEMISCH-PHYSIKALISCHE MARKER

3.2.2.1. Thermoresistenz in Aqua dest. bei 50°C

Bei den Thermoresistenzversuchen mit ENS-Viruspassagen verloren alle getesteten Stämme bei 50°C innerhalb von 60 Minuten einen Großteil ihrer Infektiosität. Wie aus Tabelle 19 ersichtlich ist, sank der Titer beim RAC-H Stamm der 10. ENS KP auf $10^{1,0}$ KID₅₀ und bei der 264. ENS KP auf $10^{1,5}$ KID₅₀; er sank somit um 4,0 - 4,5 log₁₀ gegenüber den unbehandelten Kontrollen.

Virusstämme	Infektiositätstiter (log ₁₀ KID ₅₀) nach Inkubation bei 50°C für Minuten	
	0	60
RAC-H 264.ENS	5,5	1,5
RAC-H 10.ENS	5,5	1,0
C 6505 3. ENH/10.ENS	3,75	1,0
PC 410 4. ENH/11.ENS	2,0	0,0
P 1 (V 527) 10.ENS	2,5	0,5

Tabelle 19: Ergebnisse des Thermoresistenzversuchs in Aqua dest. mit ENS-Passagen

Die Feldstämme PC 410 und P 1 (V 527) verloren ihre Infektiosität fast vollständig, beim Stamm C 6505 war ein resistenter Teil von $10^{1,0}$ KID₅₀ nachweisbar. Die Titerdifferenz betrug bei diesen Feldstämmen gegenüber den Kontrollen zwischen 2,0 und 2,75 log₁₀, es ist zu beachten, daß der Kontrolltiter wesentlich niedriger liegt bei diesen Stämmen als bei den RAC-H Stämmen.

Ähnliche Beobachtungen mit NBL-Viruspassagen an drei RAC-H Stämmen und zwei Feldstämmen sind in Tabelle 20 wiedergegeben. Bei den RAC-H Stämmen sank der Titer um 3,25 und 3,5 log₁₀ auf 0,75 und 1,5 log₁₀ KID₅₀. Bis auf eine geringe Restaktivität verloren die getesteten Feldstämme in diesem Versuch ihre Infektiosität. Die Spezifität der nach Erhitzen noch vorhandenen Infektiosität ließ sich in weiteren Passagen bestätigen.

Virusstämme	Infektiositätstiter ($\log_{10} \text{KID}_{50}$) nach Inkubation bei 50° für ... Minuten	
	0	60
RAC-H 264.ENS/1.NBL	5,0	1,5
RAC-H 419.ENS/1.NBL	4,0	0,75
RAC-H 7.ENS/1.NBL	5,0	1,5
H 1833 8. PN/2.ENS/1.NBL	2,5	0,0
H 2684 4. PN/2.ENS/1.NBL	1,5	0,0
H 3748 4. PN/2.ENS/1.NBL	1,75	0,25
PC 498 2.ENH/2.ENS/1.NBL	1,75	0,0
PC 499 2.ENH/2.ENS/1.NBL	1,0	0,0
PC 288 2.ENH/2.ENS/1.NBL	2,0	0,0

Tabelle 20: Ergebnisse des Thermoresistenzversuchs in Aqua dest. mit
NBL-Passagen

3.2.2.2. Thermoresistenz in 2 m-MgCl₂ bei 50°C

Mit den bereits im Versuch mit Aqua dest. verwendeten Virusstämmen der ENS-passagen wurden die Thermoresistenzprüfungen in 2 m-MgCl₂-Lösung durchgeführt (Tab. 21).

Virusstämme	Infektiositätstiter ($\log_{10} \text{KID}_{50}$) nach Inkubation bei 50°C in 2 m-MgCl ₂ für ... Minuten	
	0	30
RAC-H 264.ENS	5,5	2,0
RAC-H 10.ENS	5,5	0,75
C 6505 3.ENH/10.ENS	3,75	0,5
PC 410 4.ENH/11.ENS	2,0	0,0
P 1 (V 527) 10.ENS	2,5	0,0

Tabelle 21: Ergebnisse des Thermoresistenzversuchs in 2 m-MgCl₂ mit
ENS-Passagen

Nach 30 Minuten bei 50°C zeigte der RAC-H Stamm der hohen ENS-Passage einen Titerverlust von 3,5 $\log_{10}$, derjenige der niedrigen Passage einen solchen von 4,75 $\log_{10}$ gegenüber den Kontrollen. Von den getesteten Feldstämmen ließ sich bei dem Stamm C 6505 bei allerdings höherem Kontrolltiter der größere Anteil an resistenten infektiösen Partikeln in erhitzten Material nachweisen. Die beiden anderen Stämme verloren ihre Infektiosität fast vollständig.

Die Ergebnisse des Thermoresistenzversuchs in 2 m-MgCl₂ mit Rhinopneumonitisstämmen von NBL-Passagen sind in der Tabelle 22 zusammengefaßt. Der Titer sank bei den beiden RAC-H Stämmen der hohen ENS-Passage um 3,25-3,5 $\log_{10}$, beim RAC-H Stamm der niedrigen ENS-Passage ebenfalls um 3,25 $\log_{10}$. Die getesteten Feldstämme wiesen bei einem Titerverlust von 1,5 - 2,0 $\log_{10}$ noch eine leichte Infektiosität im erhitzten Material auf, mit Ausnahme des Stammes P 1 (V 527), bei dem auch in weiteren Passagen kein positiver Effekt mehr nachweisbar war.

Virusstämme	Infektiositätstiter ($\log_{10}$ KID ₅₀) nach Inkubation bei 50°C in 2 m-MgCl ₂ für ... Minuten	
	0	30
RAC-H 264.ENS/1.NBL	5,0	1,5
RAC-H 419.ENS/1.NBL	4,0	0,5
RAC-H 7.ENS/1.NBL	5,0	1,75
H 1833		
8. PN/2.ENS/1.NBL	2,5	0,5
PC 288		
2.ENH/2.ENS/1.NBL	2,0	0,5
P 1 (V 527)		
12.ENS/1.NBL	2,0	0
D 18 3.ENH/1.NBL	2,0	0,5
C 6505		
3.ENH/10.ENS/1.NBL	2,0	0,0

Tabelle 22: Ergebnisse des Thermoresistenzversuchs in 2 m-MgCl₂ mit NBL-Passagen

3.2.2.3. Thermoresistenz in PBS bei 50°C

Parallel zu den Versuchen in 2 m-MgCl₂-Lösung wurden mit den selben Rhinopneumonitisstämmen der NBL-Passagen und bei gleicher Versuchsanordnung vergleichsweise die Thermoresistenz in PBS geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 angeführt und unterscheiden sich nicht signifikant von den Ergebnissen des Thermoresistenzversuchs in 2 m-MgCl₂. Danach ist keine Einwirkung von Kationen auf den Reaktionsablauf feststellbar.

Virusstämme	Infektiositätstiter ($\log_{10}$ KID ₅₀) nach Inkubation bei 50°C in PBS für ... Minuten	
	0	30
RAC-H 264.ENS/1.NBL	5,0	1,5
RAC-H 419.ENS/1.NBL	4,0	0,5
RAC-H 7.ENS/1.NBL	5,0	1,25
H 1833		
8. PN/2.ENS/1.NBL	2,5	0,0
PC 288		
2.ENH/2.ENS/1.NBL	2,0	0,0
P 1 (V 527)		
12.ENS/1.NBL	2,0	0,25
D 18 3.ENS/1.NBL	2,0	0,5
C 6505		
3.ENH/10.ENS/1.NBL	2,0	0,0

Tabelle 23: Ergebnisse des Thermoresistenzversuchs in PBS mit NBL-Passagen

3.2.2.4. Trypsinresistenz

Gegenüber 0,25 %-igem Trypsin erwiesen sich die drei getesteten Rhinopneumonitisstämme als gleichermaßen labil. Bei beiden RAC-H Stämmen betrug die Titerdifferenz zu den Kontrollen 3,5 bzw. 4,25 $\log_{10}$. Der Feldstamm C 6505 hatte mit einem Titerabfall von 3,75 $\log_{10}$ seine Infektiosität fast vollständig verloren (Tabelle 24).

getestete Virusstämme	Infektionstiter ($\log_{10} \text{KID}_{50}$) nach Trypsin- inaktivierung bei 37°C für ... Min.	
	0	30
RAC-H 264. ENS	5,5	2,0
RAC-H 10. ENS	5,5	1,25
C 6505 3. ENH/10. ENS	5,75	0,0

Tabelle 24: Ergebnisse des Trypsinresistenzversuchs

3.2.2.5. Säurestabilität gegenüber pH 3,0 und 5,6

Beide getesteten RAC-H Stämme wurden - wie aus der Tabelle 25 zu ersehen ist - bei pH 3,0 gleichermaßen inaktiviert. Bei den Stämmen PC 712 und D 18 ließ sich nur ein kleiner resistenter Anteil durch weitere Passagen herauszüchten. Gegenüber einem pH von 5,6 zeigten RAC-H- und die Feldstämme PC 712 und D 18 nur einen geringen Titerabfall. Der Stamm P 1 (V 527) war sowohl bei pH 3,0 wie bei pH 5,6 vollständig inaktiviert worden. Das Verimpfen der reinen Pufferlösung führte in den Gewebekulturkontrollen zu keinen Veränderungen.

Virusstämme	Titer ($\log_{10} \text{KID}_{50}$)		
	pH-Wert		Kontrolle
	3,0	5,6	
RAC-H 270. ENS	1,0	5,25	5,5
RAC-H 8. ENS	0,75	5,25	5,5
PC 712 3. ENH/8. ENS	0,0	2,0	2,25
D 18 3. ENS	0,0	1,75	2,0
P 1 (V 527) 10. ENS	0	0	2,0

Tabelle 25: Ergebnisse der Säurestabilitätsprüfung bei pH 3,0 und 5,6

3.3. DISKUSSION

Marker spielen in der Virologie zur Identifizierung von Virusstämmen und der Kontrolle der Stabilität von Lebendimpfstoffen eine wichtige Rolle. Die wichtigsten bisher bekannten und in der Praxis am häufigsten verwendeten Marker sind in der Tabelle 14 zusammengefaßt worden. Von den dort angeführten Markern sind in der vorliegenden Arbeit das Wirtsspektrum auf zellulärer Ebene, die Adsorptionsfähigkeit an suspendierte Zellen, ferner die Thermoresistenz, die Säurestabilität und außerdem die Trypsinempfindlichkeit untersucht worden.

Das Verhalten der geprüften Virusstämme in verschiedenen Zellkulturen führte zu ihrer Einteilung in drei Gruppen. Es gelang nicht, ein für die Erhaltung aller getesteten Virusstämme geeignetes Zellsystem zu finden. Für 14 der untersuchten Stämme stellte ENS das optimale System dar, bedingt eignete sich für diese Stämme auch ENH. Die restlichen drei untersuchten Feldstämme nahmen gegenüber den anderen genannten Rhinopneumonitisstämmen eine Sonderstellung ein. Diese Stämme ließen sich nicht in ENS anzüchten. NHV und PC 292 konnten mit besserem Erfolg in KH, PC 651 in ENH vermehrt werden. In ENH ließen sich PC 292 und NHV erst nach 10 Passagen in KH adaptieren. Erwartungsgemäß konnte als Ausdruck der Vermehrungsfähigkeit der getesteten Rhinopneumonitisstämme in den geeigneten Zellkultursystemen, mit Ausnahme des NHV, ein typischer zytopathischer Effekt beobachtet werden. In Abhängigkeit vom Infektiositätstiter war die Ausbildung des CPE bei den RAC-H Stämmen am progressivsten und deutlichsten.

In diesem Zusammenhang überrascht, daß die beiden untersuchten RAC-H Stämme gleich hohe Titer erreichten. Nach Hallauer (25) wäre zu erwarten gewesen, daß der ENS-attenuierte Stamm im homologen Zellsystem höhere Titer erreicht als der Stamm der niedrigeren ENS-Passage. Die Ursache für das hinsichtlich Verhalten und Vermehrungsfähigkeit in den untersuchten Zellsystemen gleiche Ergebnis der geprüften RAC-H Stämme ist vielleicht darin zu sehen, daß durch die der Vermehrung in ENS vorangegangene Hamsteradaptation ein gewisser Attenuierungsgrad auch beim RAC-H Stamm der niedrigen ENS-Passage erreicht worden war.

Auf Grund dieser oben angeführten biologischen Eigenschaften ließen sich der niedrig- und der hochpassierte Stamm RAC-H von den Feldstäm-

men unterscheiden. Innerhalb der Feldstämme fiel besonders der NHV Stamm durch sein begrenztes Wirtsspektrum und die Bildung von deutlichen Kerneinschlüssen in bestimmten Kulturen als unter Umständen einziges Anzeichen einer Virusvermehrung auf.

Neben den bisher beschriebenen biologischen Merkmalen prüften wir die Fähigkeit der Rhinopneumonitisstämme, sich an suspendierte Leukozyten und Lymphozyten des Pferdes zu adsorbieren. In diesen Adsorptionsversuchen wurde der Rhinopneumonitisstamm RAC-H der hohen ENS-Passage im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Stämmen nicht an die Zellsuspension adsorbiert. Der RAC-H Stamm der niedrigen ENS-Passage und die Feldstämme wurden, an den Infektiositätstitern im Zellüberstand gemessen, signifikant aber unterschiedlich stark adsorbiert.

Um ein breiteres Merkmalsspektrum und weitere Unterscheidungsmöglichkeiten zu finden, wurden einige Rhinopneumonitisstämme auf ihr chemisches- und physikalisches Verhalten hin untersucht. Sowohl der RAC-H Stamm der hohen, wie der der niedrigen ENS-Passage und die getesteten Feldstämme wurden bei 50° C gleichermaßen inaktiviert. Bei diesen durchgeführten Inaktivierungsversuchen spielte das Lösungsmittel keine Rolle. Es wurden annähernd die gleichen Ergebnisse mit Aqua dest. und PBS, mit und ohne Mg⁺⁺ in ENS- und NBL-Kulturen erhalten.

Von den oben genannten Eigenschaften haben sich die Vermehrungsfähigkeit in Zellkulturen, speziell in ENS, ENH und NBL für die RAC-H Stämme und die Feldstämme der Gruppe II, sowie die Adsorptionsfähigkeit an Leukozyten und die Tenazität als stabil und reproduzierbar erwiesen. Die Thermostabilität -unabhängig vom untersuchten Lösungsmittel- und die rasche Inaktivierung durch Trypsin und einen pH von 3,0 waren allen untersuchten Virusstämmen eigen. Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen waren nicht signifikant und bei den Feldstämmen abhängig von den unterschiedlichen Ausgangstitern der einzelnen Stämme. Die Tenazität gegenüber den genannten Inaktivierungsmitteln scheint demzufolge keine Stammes- sondern eine Spezieseseigenschaft darzustellen. Für die Impfstoffprüfung, wo nur stammesspezifische Merkmale verwendet werden können, sind daher diese Marker unbrauchbar. Die Aussage von Bartha u.M. (3), daß bei einigen Impfstämmen die geringe Infektiosität für den Wirt mit einer größeren Stabilität des Virus gegenüber Hitze und Trypsin einhergehe, konnte in diesen Versuchen für Rhi-

nopneumonitis nicht bestätigt werden.

Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen wurden hinsichtlich des Verhaltens in Zellkulturen und der Adsorptionsfähigkeit an Leukozyten festgestellt. Beide RAC-H Stämme besaßen ein breiteres Kulturspektrum als die parallel dazu untersuchten Feldstämme. In ENS, ENH und NBL zeichneten sich die RAC-H Stämme durch eine kurze Latenzzeit, einen deutlichen CPE und das Erreichen von höheren Titern um $10^{6,0}$ KID₅₀ gegenüber den Vergleichsstämmen aus.

In den Adsorptionsversuchen liessen sich alle getesteten Rhinopneumonitisviren, ausser dem Stamm RAC-H der hohen ENS-Passage an Leukozyten adsorbieren.

Trotz der vorhandenen Unterschiede im Kulturspektrum eignet sich dieses Merkmal nicht als Marker für Rhinopneumonitisstämme, da sich mit ihrer Hilfe nicht die RAC-H Stämme untereinander und die Feldstämme innerhalb der Gruppe II von einander abtrennen lassen. Eine Unterscheidung der RAC-H Stämme untereinander kann lediglich auf Grund ihrer Adsorptionsfähigkeit an Leukozyten gemacht werden. Dieses Ergebnis ist in doppelter Hinsicht von Aussagekraft:

1. In der pathogenetischen Ereigniskette der Rhinopneumonitisinfektion, speziell des Rhinopneumonitisabortes wird die Beteiligung von zellgebundenem Virus diskutiert. Auch die Tatsache, dass es bei der Rhinopneumonitis trotz vorhandener virusneutralisierender Antikörper zur Ausbildung einer Virämie kommen kann (13) führte zu der Vermutung, dass dieses Phänomen dadurch möglich wird, dass das Virus sich intrazellulär in den Leukozyten befindet und dadurch der Wirkung neutralisierender Antikörper entzogen wird. Die Adsorption der von uns untersuchten Pferde-virulenten Stämme an Leukozyten aus dem strömenden Blut eines Pferdes spricht in-vitro für die Affinität der pferdevirulenten Rhinopneumonitisviren zu diesen Zellen. Der in ENS attenuierte, pferdevirulente Stamm liess sich nicht an die Leukozyten adsorbieren.

2. Die Beziehung zwischen Pferdepathogenität und Adsorptionsfähigkeit an Leukozyten kann als Marker für Rhinopneumonitisstämme dienen und bietet sich als Methode zur Unterscheidung des Impfstammes von Feldstämmen an.

3.4. ZUSAMMENFASSUNG

In der Literaturübersicht wird eine Zusammenstellung der wichtigsten für die Differenzierung von Virusstämmen geeigneten Marker mit entsprechenden typischen Beispielen gegeben.

Experimentell wurden bei verschiedenen virulenten und attenuierten Rhinopneumonitisvirusstämmen die folgenden Marker untersucht:

- Verhalten in verschiedenen Zellkulturen
- Adsorptionsfähigkeit an Leukozyten des Pferdes
- Thermoresistenz gegenüber 50°C in Aqua dest., einer physiologischen Lösung (PBS) und 2 m-MgCl₂
- Resistenz gegenüber Trypsin (0,25 %)
- Säurestabilität bei pH 3,0 und 5,6

Für die Differenzierung von Rhinopneumonitisvirusstämmen erwiesen sich folgende Marker als brauchbar.

1. das Wirtsspektrum auf zellulärer Ebene
2. die unterschiedliche Vermehrungsfähigkeit in den einzelnen Zellarten
3. die Adsorptionsfähigkeit an Leukozyten des Pferdes

Letztere Eigenschaft konnte auch zur Differenzierung zwischen virulenten Feldstämmen und dem an ENS attenuierten Impfstamm RAC-H verwendet werden.

Mit Hilfe chemisch-physikalischer Marker ließen sich die untersuchten Stämme nicht differenzieren.

S U M M A R Y

In the literature section a synopsis of the most important markers for the differentiation of virus strains with typical examples is given.

In experiments with various virulent and attenuated Rhinopneumonitis virus strains the following markers have been examined:

- behaviour in different cell cultures
- adsorbability to leucocytes of horses
- thermoresistance at 50°C in aqua dest., physiological solution (PBS) and 2 m-MgCl₂
- resistance to trypsin (0,25%)
- acid-resistance at pH 3.0 and pH 5.6

For the differentiation of Rhinopneumonitis virus strains the following markers proved to be useful:

1. range of hosts at cellular level
2. the varying reproductive capacity in different cell types
3. adsorbability to leucocytes of horses

This third marker could be used for the differentiation of virulent field-strains and the ENS-attenuated vaccine strain RAC-H.

With the aid of chemo-physical markers the examined strains could not be distinguished from each other.

4. A B K Ü R Z U N G E N

BHK	Hamsternierenzellstamm (Babyhamsterkidney cells)
CPE	Cytopathogener Effekt
DEAE	Diäthyaminoäthylen
DS	Dextransulfat
ENH	Hammelnieren-Primärkultur (Epithel-Niere-Hammel)
ENK	Kälbernieren-Primärkultur (Epithel-Niere-Kalb)
ENS	Schweinenieren-Primärkultur (Epithel-Niere-Schwein)
FL	Menschenamnion-Zellstamm
FLK	Fötale Lammnierenzellkultur
HAE	Hämagglutinierende Einheit
HAH-Antikörper	Hämagglutinationshemmende Antikörper
HeLa	Carzinomzellstamm (Mensch)
i.c.	intracerebral
ID ₅₀	Infektiöse Dosis ₅₀
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
I.P.	Isoelektrischer Punkt
KH	Kälberhoden-Primärkultur
KID ₅₀	Kulturinfektiöse Dosis ₅₀
KN	Kaninchennieren-Zellstamm
KP	Kulturpassage
L-Zellen	Mäusefibroblasten-Zellstamm
MK	Affennieren-Primärkultur (Monkey Kidney)
MS	Affennierenzellstamm (Monkey Stable)
MKS	Maul- und Klauenseuche
NBL	Pferdeepithel-Zellstamm (E.-Derm. NBL-6)
NT	Neutralisationstest
PBE	Plauebildende Einheit
PEG	Polyäthylenglykokoll
p.i.	post infectionem
post vacc.	post vaccinationem
SMB	Suckling Mouse Brain
SS	Sephadex-Sulfat
ZNS	Zentralnervensystem

5. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Agol, V.I. und M.Ya. Chumakova, 1962:
An agar polysaccharide and d-marker of poliovirus.
Virology 17, 221-223
2. Bachrach, H.L., 1966:
Reactivity of viruses in vitro.
Progr. med. Virol. 8, 214-313
3. Bartha, A., 1969:
The virology of equine herpesvirus 1 infection.
Proc. 2nd int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris, 18-23
4. Bartha, A., S. Belák und J. Benyeda, 1969:
Trypsin- and heat-resistance of some strains of herpesvirus group.
Acta veterinariae academiae scientiarum hungaricae 19, 97-99
5. Behrens, B., 1929:
Auswertung der Digitalisbläetter im Froschversuch.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 140, 327
6. Bengtsson, St., 1966:
Countercurrent distribution of poliovirus type 2 and 3.
Acta path. microbiol. scandinav. 68, 68-80
7. Bengtsson, St., 1968:
Genetic markers of poliovirus with special reference to the m-markers.
Acta universitatis upsaliensis
8. Bengtsson, St., 1968:
Attempts to map the poliovirus genome by analysis of selected recombinants.
Acta path. microbiol. scandinav. 73, 1-13
9. Bengtsson, St., Z. Dinter und L. Philipson, 1963:
Genetic markers associated with virulence of foot and mouth disease-virus.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 113, 1019-1022
10. Bengtsson, St. und L. Philipson, 1963:
Countercurrent distribution of poliovirus type 1.
Virology 20, 176-184
11. Bengtsson, St., L. Philipson, H. Persson und T.C. Laurent, 1964:
The basis for the interaction between attenuated poliovirus and polyions.
Virology 24, 617-625

12. Borgen, R.C., 1970:
Im Druck
13. Bryans, J.T. und M.E. Prickett, 1969:
A consideration of the pathogenesis of abortigenic disease caused by equine herpesvirus 1.
Proc. 2nd int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris, 34-40
14. Burrow, R., 1969:
The general virology of the herpesvirus group.
Proc. 2nd int. Conf. Equine Infectious Diseases, Paris,
15. Buynak, E.B. und M.R. Hilleman, 1966:
Live attenuated mumps virus vaccine: vaccine development.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123, 768-775
16. Campbell, C.H., 1969:
Virulence, adsorbability, and antigenicity of foot and mouth disease virus selected by adsorption with homogenized mouse kidney.
Arch. ges. Virusforsch. 26, 238-248
17. Carp, R.J. und H. Koprowski, 1962:
A new test of the reproductive capacity temperature marker of poliovirus: the limited thermal exposure test (LTE).
Virology 16, 71-79
18. Carp, R.J. und H. Koprowski, 1962:
Investigation of the reproductive capacity temperature marker of poliovirus.
Virology 16, 371-383
19. De Maeyer, E. und J.F. Enders, 1964/65:
Growth characteristics, interferon production and plaqueformation with different lines of edmonston measles virus.
Arch. ges. Virusforsch. 16, 151
20. Diwan, A.R., Y. Ozaki, F. Fulton und M. Benyesh-Melnick, 1962:
Antigenic analysis of poliovirus employing the disk neutralisation test.
J. Immunol. 90, 280-287
21. Doll, E.R., 1961:
Immunisation against rhinopneumonitis of horses with live virus propagated in hamsters.
Jour. Amer. Med. Assoc. 139, 1324-1330

22. Doll, E.R. und J.T. Bryans, 1963:
Immunisation of young horses against viral rhinopneumonitis.
Cornell Vet. 53, 23-41
23. Dulbecco, R. und M. Vogt, 1952:
Monolayer tissues cultures.
Proc. Nat. Acad. Sci. 38, 376
24. Dulbecco, R. und M. Vogt, 1958:
Study on the mutability of d lines of polioviruses.
Virology 5, 220-235
25. Hallauer, C., 1960:
Züchtung von Gelbfiebertvirus in menschlichen Explantaten.
Arch. ges. Virusforsch. 2, 428-444
26. Herrlich, A., 1965:
Handbuch der Schutzimpfung.
Springer Verlag
27. Hodes, H.L., H.D. Zepp und E. Ainberger, 1960:
A physical property as a virus marker. Differences in avidity of cellulose resin for virulent (Mahoney) and attenuated (LSc,2ab) strain of type 1 poliovirus.
Virology 11, 306-308
28. Huygelen, C., J. Petermans und A. Pringle, 1969:
An attenuated rubella virus vaccine (Cendehill 51 strain) grown in primary rabbit kidney cells.
Progr. med. Vir. 11, 107-125
29. Jakob, J., 1967:
Untersuchungen über die Tenazität von Rhinopneumonitis-Kulturvirus.
Inaug. Diss. München
30. Kaerber, G.
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 162, 480
31. Kanda, Y. und J.K. Melnick, 1959:
In vitro differentiation of virulent and attenuated polioviruses by their growth characteristics on MS-cells.
J. exp. Med. 109, 9-23

32. Koch, H., 1967:
Vergleichende Untersuchungen über das Verhalten des Rhinopneumonitis-Virus des Pferdes in verschiedenen Zellkulturen.
Zbl. Vet. Med. 14, 493-506
33. Kodatski, W., 1949:
Taschenbuch der praktischen pH-Messung.
München, 49
34. Lwoff, A., 1959:
Factors influencing the evolution of viral diseases at the cellular level and in the organism.
Bact. Rev. 23, 109-124
35. Mayr, A., 1958:
Abnahme der Pathogenität des Virus der ansteckenden Schweinelähme durch Gewebekulturpassagen.
Mh. Tierhk. 10, 186-191
36. Mayr, A., H.O. Boehm, J. Brill und S. Woyciechowska, 1965:
Charakterisierung eines Stutenabortvirus aus Polen und Vergleich mit bekannten Rhinopneumonitisvirus-Stämmen des Pferdes.
Arch. ges. Virusforsch. 17, 216-230
37. Mayr, A., J. Pette, K. Petzold und K. Wagner, 1968:
Untersuchungen zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen die Rhinopneumonitis (Stutenabort) der Pferde.
Zbl. Vet. Med. 15, 406-418
38. Mayr, A., K. Strohmeier und R. Lorenz, 1961:
Veränderungen chemisch-physikalischer Eigenschaften des Virus der ansteckenden Schweinelähmung (Teschner Krankheit) während des Modifizierungsprozesses durch Dauerpassagen in Schweinenierenkulturen.
Arch. ges. Virusforsch. 11, 183-196
39. Mayr, A. und G. Wittmann, 1960:
Virusdauerpassagen in Zellkulturen als modifizierender Faktor für die Entwicklung einer Lebendvaccine gegen Maul- und Klauenseuche.
Zbl. Vet. Med. 7, 829-840

40. Medill-Brown, M. und B.A. Briody, 1955:
Mutation and selection pressure during adaptation of influenza virus to mice.
Virology 1, 305-312
41. Oxford, J.S. und C.W. Potter, 1970:
An immunologic marker technique for the cendehill vaccine strain of rubella virus.
J. Immunol. 105, 818-823
42. Ozaki, Y., A.R. Diwan, W.D. McBride und J.L. Melnick, 1963:
Antigenic characterization of oral poliovaccine progeny by neutralization kinetics.
J. Immunol. 90, 288-296
43. Ozaki, Y., A.R. Diwan, M. Takizawa und J.L. Melnick, 1965:
Chromatography of poliovirus on calcium phosphate and its application to the identification of vaccine progeny strains.
J. Bact. 89, 603-610
44. Parker, J.R., A.G. Wouters und M.S. Smith, 1969:
Physical changes of wesselbron virus occurring during attenuation in foetal lamb kidney cells.
Arch. ges. Virusforsch. 26, 305-320
45. Parkman, P.D. und H.M. Meyer jr., 1969:
Prospects for a rubella virus vaccine.
Progr. Med. Virol. 11, 80-106
46. Pette, J., 1966:
Development of living virus vaccine against rhinopneumonitis of horses.
Proceedings of the First International Conference on Equine Infectious Diseases, Stresa (Italy)
47. Petzold, K., 1970:
Habilitationsschrift der Tierärztlichen Hochschule Hannover
48. Plotkin, S.A., 1962/63:
The polioviruses of man.
Ann. NY. Acad. Sci. 101, 357-389
49. Plotkin, S.A., B.J. Cohem und H. Koprowski, 1961:
Intratypic serodifferentiation of polioviruses.
Virology 15, 473-485

50. Pringle, C.R., 1964:
Genetic aspects of the thermal inactivation properties of foot-and-mouth virus strains.
Bull. off. int. Epiz. 61, 619-628
51. Rolle und A. Mayr, 1966:
Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
52. Sellers, R.F., 1963:
Virulence and interferonproduction of strains of foot-and-mouth disease virus.
J. Immunol. 93, 6-12
53. Shimizu, T., R. Ishizaki und M. Matumoto, 1963:
Serological survey of equine rhinopneumonitis virus infection among horses in Japan.
Japan J. Exp. Med. 33, 133-147
54. Takemoto, K.K. und H. Liebhaver, 1961:
Virus-polysaccharide determining plaque morphology of EMC virus.
Virology 14, 456-462
55. Theiler, M. und H.H. Smith, 1937:
The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus.
J. Exp. Med. 65, 767-786
56. Thomsson, R., 1966:
In-vitro-Merkmale von Polioviren.
Ergebn. Mikrobiol. Immun. exp. Ther. 39, 194-242
57. Thomsson, R., V. Dostal, R. Haas und E. Ruschmann, 1960:
Untersuchungen zur thermischen Resistenz von Polioviren.
Arch. ges. Virusforsch. 2, 571-581
58. Thomsson, R. und M. Majer, 1964:
Differentiation of poliovirus type 3 strains by aluminium-hydroxide.
Arch. ges. Virusforsch. 14, 735
59. Vogt, M., R. Dulbecco und H.A. Wenner, 1957:
Mutants of poliomyelitis viruses with reduced efficiency of plating in acid medium and reduced neuropathogenicity.
Virology 4, 141-155

60. Wallis, C. und J.L. Melnick, 1963:
Selection of attenuated poliovirus from virulent suspension by heating in aluminium chloride.
Virology 19, 483-490
61. Wallis, C., J.L. Melnick und I.L. Wimberly, 1963:
Differentiation and separation of attenuated and virulent polioviruses by adsorption to aluminium salts.
Amer. J. Hyg. 77, 250-257
62. Wecker, E., 1960:
A simple test for serodifferentiation of poliovirus strains within the same type.
Virology 10, 376-379
63. Younger, J.S., 1954:
Monolayer tissue cultures:
I. Preparations and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 85, 202

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Mayr
für die freundliche Ueberlassung des Themas danken.
Ausserdem gilt den Mitarbeitern des Institutes für
die Unterstützung mein besonderer Dank.

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 10. 12. 1944 in Salisbury, Süd-Rhodesien, als Tochter des Diplom-Tropenlandwirts Hans von Streng und seiner Frau Ruth, geb. Münch, geboren.

Während der vier Grundschuljahre wurde ich von meiner Mutter in Äthiopien unterrichtet. 1955 trat ich in die 1. Oberschulklasse des staatlichen Internatsgymnasiums Schloss Plön ein. Ab Herbst 1962 besuchte ich die Deutsche Evangelische Oberschule in Kairo, wo ich 1964 das Abitur des mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweiges bestand.

Mit dem Sommersemester 1964 begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin, wo ich das Vorphysikum und das Physikum absolvierte. Das 6. Semester belegte ich an der Tierärztlichen Hochschule in Wien. Für das Sommersemester 1967 immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilian-Universität München, wo ich im Frühjahr 1969 das Staatsexamen der Veterinärmedizin ablegte.

